

فهرست مطالب

VII.....	چکیده فارسی
۱.....	فصل اول
۱.....	مقدمه، کلیات و مرور مطالب
۲.....	۱-۱: مقدمه و اهداف پایان نامه
۷.....	اهداف اصلی:
۷.....	اهداف فرعی:
۷.....	هدف کاربردی:
۷.....	سوالات پژوهش:
۸.....	۲-۱: کلیات و مرور مطالب
۱۴.....	انگل لیشمانیا (<i>Leishmania</i>)
۱۵.....	طبقه بندی انگل لیشمانیا
۱۸.....	چرخه زندگی انگل لیشمانیا
۲۰.....	ساختمان ژنوم انگل لیشمانیا
۲۳.....	لیشمانیوز جلدی روستایی (Zoonotic Cutaneous leishmaniasis = ZCL) در ایران
۲۵.....	مخازن لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران
۲۸.....	حشره شناسی پشه خاکی ها
۳۵.....	ناقلین لیشمانیوز در ایران
۴۱.....	اینترلوکین ۴ (IL4)، پلی مورفیسم و نقش آن در سیستم ایمنی بیماران لیشمانیوز جلدی
۵۱.....	فصل دوم
۵۱.....	مواد و روشهای مطالعه
۵۲.....	۲-۱- منطقه مورد بررسی

۵۲	۲-۱-۱: استان خراسان شمالی
۵۸	۲-۲: روش اجرا
۵۸	روستاهای مورد مطالعه:
۶۰	بررسی آلودگی انگلی پشه خاکی های صید شده به روش مولکولی:
۶۰	استخراج DNA :
۶۴	بررسی مخازن بیماری لیشمانیوز جلدی
۶۵	بررسی پلی مورفیسم اینتر لوکین ۴ (IL4) در بیماران لیشمانیوز با تظاهرات کلینیکی مختلف:
۶۶	نمونه گیری از زخم موارد انسانی مثبت لیشمانیوز:
۶۶	روش الکتروفورز روی ژل آگارز:
۶۹	تعیین آلودگی با استفاده از تکثیر حلقه های کوچک kDNA کیتوپلاست:
۷۱	آماده کردن مخلوط اصلی یا (Reaction buffer/Master Mix):
۷۲	تهیه مخلوط اصلی (Master mix) به منظور تکثیر حلقه های کوچک kDNA کیتوپلاست:
۷۷	تعیین آلودگی با استفاده از تکثیر rDNA به روش Conventional PCR :
۷۹	تعیین توالی نمونه های مثبت شده از طریق ژن ITS1:
۸۰	مقایسه توالی ها (Alignment):
۸۱	: بررسی پلی مورفیسم اینتر لوکین ۴ (IL-4) در بیماران لیشمانیوز
۸۵	فصل سوم
۸۵	یافته ها و نتایج
۸۶	۳-۱: ناقلین عوامل بیماری
۸۶	۳-۱-۱: گونه های جمع آوری شده پشه خاکی
۸۷	۳-۲: مطالعات مولکولی
۸۷	۳-۲-۱ تشخیص اولیه آلودگی پشه خاکی ها به انگل لیشمانیا
۸۸	۳-۲-۲ تعیین هویت اولیه انگل های لیشمانیا در ناقلین عامل بیماری:
۹۰	۳-۲-۳ نتایج انجام واکنش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) با آنزیم HaeIII

۳-۲-۴: نتیجه BLAST انگل <i>L. major</i> جدا شده از پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی	۹۱
۳-۳: بررسی مخازن بیماری از نظر آلودگی به انگل لیشمانیا	۹۹
۳-۳-۱: جوندگان صید شده	۹۹
۳-۳-۲: بررسی آلودگی جوندگان صید شده به انگل لیشمانیوز	۱۰۰
۳-۴: بررسی نمونه های انسانی از نظر آلودگی به انگل لیشمانیا	۱۰۹
۳-۴-۱: تشخیص اولیه آلودگی به انگل لیشمانیا در نمونه های بیمار و همسانی آن با نمونه های مخزن و ناقل	۱۰۹
۳-۴-۲: تعیین هویت اولیه انگل های لیشمانیا در مخازن عامل بیماری	۱۱۰
۳-۴-۳: نتایج انجام واکنش (RFLP) با آنزیم <i>HaeIII</i> برای نمونه های مثبت انسان	۱۱۲
۳-۴-۴: نتیجه BLAST انگل <i>L. major</i> جدا شده از نمونه مثبت انسان	۱۱۲
۴: بررسی پلی مورفیسم اینتر لوکین (IL-4) در بیماران لیشمانیوز با تظاهرات کلینیکی مختلف:	۱۱۸
فصل چهارم	۱۲۴
بحث و پیشنهادات	۱۲۴
نتیجه گیری:	۱۳۳
پیشهادات:	۱۳۴
خلاصه انگلیسی	Error! Bookmark not defined.
منابع انگلیسی و فارسی	۱۳۸

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: پراکندگی جغرافیایی لیشمانیوز جلدی ۹
- شکل ۲-۱: پراکندگی جغرافیایی لیشمانیوز جلدی ایجاد شده به وسیله گونه *L. major* در دنیای قدیم ۹
- شکل ۳-۱: پراکندگی جغرافیایی لیشمانیوز احشایی در دنیای قدیم و جدید (WHO, ۲۰۱۰) ۱۰
- شکل ۴-۱: میانگین بروز لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران، سال ۱۳۸۰ تا ۱۳۹۰ ۱۲
- شکل ۵-۱: سمت راست پروماستیگوت های تاژک دار، سمت چپ آماستیگوت های داخل سلولی. ۱۵
- شکل ۶-۱: طبقه بندی انگل های لیشمانیا و گونه های شناخته شده آن. ۱۸
- شکل ۷-۱: اشکال مختلف انگل در معده پشه خاکی ۲۰
- شکل ۸-۱: پراکندگی کانون های بیماری لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران ۲۴
- شکل ۹-۱: نقشه های پراکندگی مخازن لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران ۲۷
- شکل ۱۰-۱: پراکندگی ناقلین لیشمانیوز جلدی شهری و روستایی در ایران ۳۹
- شکل ۱۱-۱: پراکندگی ناقلین بیماری لیشمانیوز احشایی در ایران ۴۰
- شکل ۱۲-۱: مروری بر روند القا و عملکرد سایتوکاین ها. ۴۲
- شکل ۱۳-۱: شکل گیری زیر رده های TH1 و TH2 با محیط سایتوکاینی ۴۳
- شکل ۱۴-۱: تولید و تنظیم مقاطع زیر مجموعه های T Helper به واسطه سایتوکاین ها. ۴۴
- شکل ۱۵-۱: ساختار کریستالی و ژنی اینترلوکین ۴۵
- شکل ۱۶-۱: پاسخ سیستم ایمنی در حضور و یا نبود اینترلوکین ۴ ۴۶
- شکل ۱-۲: موقعیت شهرستان اسفراین در استان خراسان شمالی ۵۳
- شکل ۲-۲: مراحل مونته و تشخیص پشه خاکی ها ۶۰
- شکل ۳-۲: مراحل استخراج DNA ۶۳
- شکل ۴-۲: چونندگان صید شده و مراحل نمونه برداری از آنه ۶۵
- شکل ۵-۲: مراحل انجام PCR و الکتروفورز وژی مولکولی، دانشکده بهداشت دانش ۶۸

شکل ۳-۱: الکتروفورز محصول PCR مولکول DNA.....	۸۸
شکل ۳-۲: الکتروفورز محصول PCR.....	۸۹
شکل ۳-۳: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ناحیه ITS1 برای تشخیص گونه های لیثمانیا.....	۹۰
شکل ۳-۴: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل <i>L.major</i>	۹۲
شکل ۳-۵: BLAST توالی <i>L.major</i> سکانس شده از <i>P.papatasi</i>	۹۳
شکل ۳-۶: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1.....	۹۴
شکل ۳-۷: BLAST نمونه <i>L.turanica</i> در <i>P.papatasi</i>	۹۵
شکل ۳-۸: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1.....	۹۷
شکل ۳-۹: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1.....	۹۸
شکل ۳-۱۰: BLAST نمونه <i>L. major</i> در پشه خاکی <i>P.salehi</i>	۹۸
شکل ۳-۱۱: فرم آماسیگوت انگل لیثمانیا در لام تهیه شده از رومومیس اییموس صید شده.....	۱۰۱
شکل ۳-۱۲: نتایج حاصل از PCR مربوط به لوکوس KDNA نمونه های آلوده به انگل لیثمانیا مازور.....	۱۰۲
شکل ۳-۱۳: نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن ITS1.....	۱۰۳
شکل ۳-۱۴: نتایج حاصل از RFLP مربوط به تعدادی از محصولات PCR نمونه های آلوده به انگل.....	۱۰۴
شکل ۳-۱۵: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل <i>L.major</i>	۱۰۵
شکل ۳-۱۶: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1.....	۱۰۶
شکل ۳-۱۷: BLAST نمونه <i>L.major</i> در جونده <i>R.opimus</i> با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن.....	۱۰۸
شکل ۳-۱۸: نتایج حاصل از PCR مربوط به لوکوس KDNA نمونه های آلوده به انگل پشه خاکی.....	۱۱۰
شکل ۳-۱۹: نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن ITS1 نمونه های انسانی.....	۱۱۱
شکل ۳-۲۰: نتایج حاصل از RFLP مربوط به تعدادی از محصولات PCR نمونه های آلوده به انگل.....	۱۱۲
شکل ۳-۲۱: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل <i>L.major</i>	۱۱۳
شکل ۳-۲۲: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1.....	۱۱۴
شکل ۳-۲۳: BLAST نمونه <i>L.major</i> در انسان با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن.....	۱۱۵
شکل ۳-۲۴: BLAST نمونه <i>L.major</i> در انسان با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن.....	۱۱۶

- شکل ۳-۲۵: BLAST نمونه *L. major* در انسان با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن ۱۱۷
- شکل ۴-۱: نتیجه الکتروفورز ۱۱ نمونه در ژل دو درصد مربوط به پروموتر ژن اینترلوکین ۴ انسانی ۱۱۹
- شکل ۴-۲: نتایج چند نمونه مربوط به محصول RFLP پروموتر ژن اینترلوکین ۴ انسانی ۱۲۰
- شکل ۴-۳: فیلوگرام ژن پروموتو اینتر لوکین ۴ در نمونه های انسانی مبتلا به لیشمانیوز ۱۲۲
- شکل ۴-۴: کلادوگرام ژن پروموتو اینتر لوکین ۴ در نمونه های انسانی مبتلا به لیشمانیوز ۱۲۳

فهرست جداول

- جدول ۱-۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر حلقه های کوچک KDNA کیتوپلاست ۷۰
- جدول ۲-۲: تهیه مخلوط اصلی و مقادیر مورد نیاز به منظور تکثیر حلقه های کوچک KDNA کیتوپلاست در مرحله اول ۷۳
- جدول ۲-۳: سیکلهای حرارتی مرحله اول واکنش NESTED PCR ۷۴
- جدول ۲-۴: تهیه مخلوط اصلی و مقادیر مورد نیاز به منظور تکثیر حلقه های کوچک KDNA کیتوپلاست در مرحله دوم ۷۵
- جدول ۲-۵: سیکلهای حرارتی مرحله دوم واکنش NESTED PCR ۷۶
- جدول ۲-۶: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن ITS1 ۷۷
- جدول ۲-۷: تهیه مخلوط اصلی (MASTER MIX) به منظور تکثیر RDNA به روش CONVENTIONAL PCR ۷۸
- جدول ۲-۸: سیکلهای حرارتی واکنش تکثیر RDNA به روش STANDARD PCR ۷۹
- جدول ۲-۹: سیکلهای حرارتی واکنش تکثیر P. IL4 به روش PCR ۸۳
- جدول ۲-۱۰: تهیه مخلوط اصلی (MASTER MIX) به منظور تکثیر P.IL4 به روش STANDARD PCR ۸۴
- جدول ۳-۱: فراوانی و گونه صید شده در روستاهای مورد مطالعه ۸۶
- جدول ۳-۲: فراوانی و ترکیب نسبی گونه ای جونندگان صحرایی صید شده ۱۰۰
- جدول ۴-۱: تقسیم نمونه ها به گروههای پنجگانه و کد نمونه ها و نتیجه ژنوتیپ مربوط به SNP پروموتر ژن اینترلوکین ۴ ۱۲۱

چکیده فارسی

مقدمه: در مقوله کنترل لیشمانیوز، این بیماری در زمره یکی از فراموش شده ترین بیماری های مناطق گرمسیری به شمار می رود. تخمین زده شده که تحمیل بار بیماری ۲۳۴۰۰۰۰ مورد از کار افتادگی در جهان است. در حال حاضر ۹۸ کشور جهان به انواع مختلف این بیماری آلوده می باشند. در ایران بیماری در ۱۷ استان کشور بومی می باشد و یکی از کانون های مهم این بیماری در استان خراسان شمالی شامل اسفراین و روستاهای آن میباشد. علیرغم گذشت نیم قرن از شناخت شیوع لیشمانیوز جلدی در کانون شهرستان اسفراین واقع در استان خراسان شمالی و مداخلات گوناگون جهت کنترل بیماری، میزان بروز این بیماری در منطقه همچنان بالاست. به طوریکه بر اساس آمار بیماریابی پاسیو انجام شده طی سال ۸۹ - ۱۳۸۸ بیش از ۵۰۰ مورد لیشمانیوز جلدی از این استان گزارش شده بود. مطالعه حاضر با هدف اصلی تعیین آلودگی لیشمانیایی ناقلین، مخازن، بیماران و ارتباط بین پلی مورفیسم پروموتر IL-4 با تظاهرات کلینیکی در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در کانون اندمیک شهرستان اسفراین انجام شده است.

مواد و روش کار: صید پشه خاکی ها با تله های چسبان و تعیین آلودگی آنها به انگل لیشمانیا با استفاده از لوکوس های *kdna, ITS1* انجام گردید. تعیین گونه ها با استفاده از کلید های تشخیصی معتبر و استخراج DNA با استفاده از کیت کیاژن به انجام رسید (طبق دستورالعمل). صید جوندگان با استفاده از تله های زنده گیر شرمش و تعیین آلودگی آنها به انگل لیشمانیا با استفاده از لوکوس های *kdna, ITS1* انجام شد. در ادامه این مطالعه نمونه گیری از زخم تازه چهل بیمار و تعیین آلودگی آنها به انگل لیشمانیا به روش مولکولی بر حسب ژن

های هدف ITS1 و kDNA به انجام رسید. لام های مثبت از نظر انگل لیشمانیا به روش های - kDNA NESTED PCR و ITS1 PCR- RFLP تعیین هویت گردیدند.

در بررسی پلی مورفیسم پروموتور اینتر لوکین ۴ (IL-4) ، پنجاه نمونه خون انسانی با تظاهرات مختلف از بیماری سالک پوستی، طول دوره درمان و همچنین افراد سالم و فاقد زخم تهیه گردید. تمامی نمونه های خون انسانی PCR و با آنزیم Eco47I برای انجام RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مطالعه با استفاده از نرم افزار-SPSS Version 18 و آزمون χ^2 (Non parametric) آنالیز شد. کلیه محصولات PCR مثبت به انگل لیشمانیا و نمونه های خون جهت تعیین توالی نوکلئوتید از طریق شرکت تکاپو زیست به شرکت Bioneer کره ارسال شدند. آنالیز توالی ها و ثبت ژن از طریق سایت www.ncbi.nih.gov.org انجام شد. برای رسم فیلوگرام و کلا دو گرام نمونه ها از نرم افزار CLUSTALw و سایت www.ebi.ac.uk/clustalw استفاده شد.

نتایج: در تعیین ناقلین و میزان آلودگی آنها به انگل لیشمانیا از ۳۹۰ نمونه از پشه خاکیهای ماده، چهار نمونه (۱/۰۲٪)

(شامل گونه های *Phlebotomus papatasi* و *Phlebotomus salehi* آلوده به انگل های *Leishmania major* و *Leishmania turanica* بودند. یک مورد آلودگی میکس در گونه *P. papatasi* به هر دو انگل مشاهده شد. نمونه های مثبت به انگل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تورانیکا همگی با نمونه های ثبت شده در بانک جهانی ژن ۱۰۰٪ تشابه داشتند. در این بررسی دو گونه *Phlebotomus papatasi* و *Phlebotomus salehi* به ترتیب ناقلین اصلی و ثانویه لیشمانیوز معرفی می گردند.

در بررسی مخازن بیماری در مجموع ۴۴ سر جونده شامل دو گونه *Rhombomys opimus* و *Meriones libycus* صید شد. گونه غالب منطقه با فراوانی در حدود ۷۳٪، جونده رومبومیس اپیموس بود. بر اساس آزمایشات مولکولی تمامی نمونه های رومبومیس اپیموس ، آلوده به انگل *L. major* تشخیص داده شدند. شش نمونه از موارد مثبت با نام های KJ577703, KJ577704, KJ577705, KJ577706, KJ577707 و KJ577708 در بانک جهانی ژن به ثبت رسیدند. تمامی این شش نمونه از لحاظ توالی نمونه های انگل مشاهده شده در ناقلین آلوده به انگل *L. major* ۱۰۰٪ تشابه داشتند. نمونه های لام تهیه شده از جونده مریونس لیبیکوس همگی از نظر آلودگی به انگل لیشمانیا ماژور منفی و بررسی های مولکولی نیز موید آن بودند. در بررسی عفونت انسانی به انگل لیشمانیا، کلیه لام های تهیه شده از زخم موارد انسانی ، پس از بررسی میکروسکوپی با روش مولکولی ارزیابی و همگی

L. major تشخیص داده شدند. سه مورد از این نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید که با شماره KM052753 در بانک جهانی ژن قابل دسترس می باشد.

یکی از اهداف مهم این پایان نامه بررسی پلی مرفیسم اینترلوکین ۴ با توجه به تظاهرات کلینیکی مختلف در موارد لیشمانیوز بود. در این راستا، از پنجاه نمونه مورد بررسی که به پنج گروه بیماران با بیش از دو زخم حاد، بیماران دارای دو زخم متوسط، بیمارانی که طول دوره درمان آنها بین ۲-۶ ماه بود، بیمارانی که طول دوره درمان آنها کمتر از ۲ ماه بود و بالاخره گروهی که هیچ زخم و یا اسکار نداشتند، ۴ مورد (۸٪) با ژنوتیپ CT، یک مورد (۲٪) با ژنوتیپ TT و بقیه نمونه ها با فراوانی (۹۰٪) با ژنوتیپ CC تشخیص داده شدند. سه مورد (۶٪) از ژنوتیپ های CT مربوط به بیمارانی بود که زخم های حاد یا متوسط داشتند و ژنوتیپ دیگر (۲٪) CT مربوط به بیماری بود که طول درمان آن بیشتر از دو ماه بود. یک نمونه (۲٪) با ژنوتیپ TT در بیماری که طول درمان آن کمتر از دو ماه بود، مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری: در مطالعه حاضر، ما موفق به یافتن DNA انگل های لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا میجر در فلبو توموس پاپاتاسی شدیم. این یافته ها در تناقض با مفهوم انتقال انحصاری لیشمانیا میجر به صورت restricted می باشد، اما در عین حال در تطابق با یافته های دیگر محققین در ایران و جهان بود.

با توجه به وفور بالای جونده رومبومیس اپیموس (۷۳٪) در منطقه مورد مطالعه، تایید آلودگی آن به انگل لیشمانیا به روشهای میکروسکوپی و مولکولی و همسانی صددر صدی با انگل مشاهده شده در ناقل، این جونده به عنوان مخزن اصلی و قطعی لیشمانیوز جلدی با عامل لیشمانیا ماژور معرفی می گردد و رل اصلی در چرخش انگل در بین ناقلین و ساکنین در منطقه مورد مطالعه را ایفا میکند.

در بررسی پلی مرفیسم پروموتر اینترلوکین ۴، آنالیز فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در پنج گروه از جامعه انتخابی، اختلاف بسیار معنی داری نشان داد ($\chi^2=56.4$; $df=2$; $p=0.00$). در این بررسی رابطه معنی داری بین ژنوتیپ پروموتر اینترلوکین ۴ با تظاهرات کلینیکی و زمان درمان بیماران مشاهده نشد.

فصل اول

مقدمه، کلیات و مرور مطالب

۱-۱: مقدمه و اهداف پایان نامه

لیشمانیوزها بطور گسترده ای در تمام دنیا پراکنده اند و از ۹۸ کشور دنیا گزارش شده است که اغلب آنها کشور های در حال توسعه و یا فقیر می باشند. حدود ۱۲ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می باشند و سالانه حدود دومیلیون موارد جدید لیشمانیوز در جهان تخمین زده می شود. ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلاء به آن قرار دارند (۵).

بیشترین موارد لیشمانیوز جلدی دنیای قدیم ناشی از ۲ گونه *Leishmania major* و *L. tropica* و ۹۰٪ موارد جدید از کشورهای افغانستان، ایران، عربستان سعودی، سوریه، الجزایر، برزیل و پرو گزارش می گردد. لیشمانیا ماژور عامل لیشمانیوز جلدی زئونوتیک (روستایی) است که در مناطق وسیعی شامل غرب، شمال و شرق آفریقا، خاور میانه و آسیای مرکزی انتشار دارد. لیشمانیا تروپیکا عامل لیشمانیوز جلدی انتروپوتیک (شهری) است که در مناطق مختلف خاور میانه و خاور نزدیک دیده می شود. سایر گونه های ایجاد کننده لیشمانیوز جلدی پراکندگی محدودتری دارند. برای مثال *Leishmania aethiopica* در اتیوپی و کنیا، *L. arabica* در عربستان سعودی، *L. killicki* در تونس و *L. turanica* و *L. gerbilli* (گونه های لیشمانیای جونندگان) در آسیای مرکزی و ایران شایع می باشند (۵).

کشور ما از کانون های مهم لیشمانیوز جلدی است، به طوری که فرم روستایی آن در بیش از ۱۷ استان و فرم شهری در بیش از ۸ استان کشور به صورت بومی انتشار دارد. فرم احشایی لیشمانیوز (کالاآزار) نیز در ۷ استان کشور ایران به صورت بومی است و در سایر مناطق اسپورادیک دیده می شود. سالانه بیش از ۲۰۰۰۰ مورد بیمار مبتلا به لیشمانیوز در کشور گزارش می گردد (۱).

مطالعات اپیدمیولوژی انگل های لیشمانیا از اولویت های عمده تحقیقاتی در کشور ما بوده و بسیار مورد تاکید سازمان جهانی به ویژه سازمان جهانی بهداشت (WHO) است. این مطالعات شامل شناسایی ناقلین، مخازن و بیماران می باشد. شکل رایج مطالعات اپیدمیولوژی با بهره گیری از روش های پارازیتولوژی برای شناسایی گونه انگل دارای محدودیت هایی است که امروزه استفاده از روش های مولکولی به طور قابل توجهی از این محدودیت ها کاسته و بر حساسیت تشخیصی افزوده است. مطالعات اپیدمیولوژی فراگیر (ناقلین، مخازن و بیماران) سیمای روشن تری از وضعیت این بیماری در مناطق مورد مطالعه به تصویر می کشد و اطلاعات جامع تری در خصوص اتخاذ

روش های مبارزه با بیماری و ارائه راهکارهای کنترل و پیش گیری فراهم می کند. علیرغم گذشت نیم قرن از شناخت شیوع لیشمانیوز جلدی در کانون شهرستان اسفراین واقع در استان خراسان شمالی و علیرغم مداخلات گوناگون جهت کنترل بیماری، میزان بروز این بیماری در منطقه همچنان بالاست. به طوریکه بر اساس آمار بیماریابی پاسیو انجام شده طی سال ۸۹ - ۱۳۸۸ بیش از ۵۰۰ مورد لیشمانیوز جلدی از این استان گزارش شده است که از اینها ۶۰/۲٪ مردان و ۳۹/۸٪ زنان بودند. ضایعات پوستی به ترتیب روی صورت ۲۳/۴٪، دست ۴۰/۶٪، پا ۲۵/۵٪، تنه ۵/۲٪ و در سر و گردن ۵/۳٪ بود. در مجموع ۴۲/۱٪ بیماران دارای یک ضایعه، ۲۱٪ دارای دو ضایعه و ۳۶/۹٪ دارای سه ضایعه و بیشتر بودند. بیشترین موارد گزارش شده لیشمانیوز جلدی مربوط به شهرستان اسفراین ۱۹۸ مورد (۴۰/۸٪) و جاجرم ۱۶۰ مورد (۳۳٪) بود (۱)

تشخیص دقیق گونه انگل های لیشمانیا با مشاهده میکروسکوپی لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا امکان پذیر نیست و برای تشخیص گونه نیاز به جداسازی انگل، کشت آن و تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی و یا استفاده از روش ایزوآنزیم می باشد که انجام آنها وقت گیر و پرهزینه بوده و مستلزم تکثیر انگل به تعداد زیاد می باشد. همچنین در مواردی که عفونت مختلط وجود دارد، روش های کشت از کارآیی مناسب بر خوردار نیستند و آلودگی محیط های کشت نیز از محدودیت های این روش است. از طرف دیگر، در مطالعات مختلف برتری روش های مولکولی بر کشت و میکروسکوپی نشان داده شده است. به طور مثال در مطالعه Bensoussan و همکاران بر روی ۹۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوز جلدی، روش مولکولی با استفاده از kDNA دارای بیشترین حساسیت بود (۲). در مطالعه Aviles و همکاران حساسیت PCR (۹۲٪) بیش از دو برابر روش میکروسکوپی (۴۲٪) بود (۳). همینطور در مطالعه Kumar و همکاران که در مناطق اندمیک ایالت راجاستن هند بر روی ۹۸ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی انجام شد، حساسیت روش kDNA-PCR، ۹۶/۶٪ و روش ITS1-PCR، ۸۲/۷۵٪ بود و حال آنکه ۴۸/۲٪ موارد به روش کشت و ۶۵/۵٪ موارد به روش مستقیم میکروسکوپی تشخیص داده شدند (۲).

از زمانی که روش های مولکولی متکی بر DNA به عنوان یک ابزار تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا به کمک تشخیص بیماری ها و عوامل عفونی مسبب بیماری ها آمده است، استفاده از این روش ها به طور روزافزون جهت شناسایی گونه های مختلف انگل های لیشمانیا در ناقلین، مخازن حیوانی و بیماران مبتلا به لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین از این روش ها در سالهای اخیر در مطالعات فیلد برای تعیین Vectorial

Competency پشه خاکی های فلبوتومینه و تغییرات فصلی پشه خاکی های آلوده به انگل های لیشمانیا با موفقیت استفاده شده است. با این روش ها می توان حتی تعداد کم انگل به شکل لیپتومونایی آن را در داخل لوله گوارش ناقل شناسایی کرد. از نظر تئوری وجود یک انگل در بدن پشه خاکی برای شناسایی آن به روش PCR کفایت می کند، اما در عمل نشان داده شده است که برای استخراج DNA از انگل *L. braziliensis* به حداقل ۵ انگل نیاز می باشد. ژن های مختلفی به عنوان هدف در تشخیص مولکولی انگل های لیشمانیا و تمایز گونه های آن مورد استفاده قرار گرفته است، از قبیل gp63، α polymerase و 18S ribosome subunit. و ژن های kinetoplast DNA (kDNA). ژن kDNA از مارکرهای مهم شناسایی مولکولی انگل های لیشمانیاست و ژن های minicircle آن از اهداف مهم تشخیصی این انگل می باشد. کینتوپلاست حاوی تقریباً ۱۰۰۰۰ DNA حلقوی کوچک است که به عنوان kDNA minicircles شناخته می شوند که در گونه های لیشمانیا با اندازه های بین ۶۰۰ و ۸۰۰ bp می باشند (۵۸،۵۹). فراوانی این مولکول ها سبب شده است تا هدف تست های تشخیصی مولکولی قرار گیرند. ۱۰۰۰۰ مینی سرکل کینتوپلاست در بین حدود ۱۰ دسته سکانس مختلف پخش می باشد. داخل هر دسته مینی سرکل، سکانس ۱ تا ۲ درصد فرق می کند. تعداد مینی سرکل ها در هر دسته خیلی متغیر است. مینی سرکل به ناحیه ثابت تقریباً ۱۲۰ bp و ناحیه متغیر تقریباً ۶۰۰ bp تقسیم می شود. نواحی ثابت دارای قطعات کوتاهتری است که در تمام جنس لیشمانیا ثابت می باشند. این قطعات سکانس تثبیت شده، هدف های عالی برای پرایمرهای PCR می باشند که می تواند همه دسته های مینی سرکل های شناخته شده تمامی گونه های لیشمانیا را آمپلی فای کند. تعداد کپی بالای مینی سرکل های لیشمانیا باعث شده است تا آنها به عنوان هدف عالی تست های تشخیصی مورد توجه قرار گیرند، از هتروژنی ناحیه متغیر نیز برای افتراق بین سویه ها استفاده می شود (۵۸،۵۹).

یکی دیگر از ژن های هدف مهم که در تشخیص انگل های لیشمانیا کاربرد زیادی دارد، ژن Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) می باشد. ITS1-PCR تا حد زیادی حساس و اختصاصی است و قادر است ۰/۲ انگل به ازای نمونه را شناسایی کند. این متد به ویژه در جاهایی که بیش از یک گونه انگل لیشمانیا وجود دارد، مفید می باشد. از روش ITS1-PCR- RFLP می توان به طور مستقیم برای شناسایی گونه انگل در نمونه های بالینی استفاده کرد (۶۰،۶۱).

در ایران راثی و همکاران در طی سالهای ۲۰۱۲-۲۰۰۴ مطالعات مولکولی گسترده ای با استفاده از روشهای Nested PCR، SemiNested PCR و RAPD-PCR و ژن های هدف kDNA و ITS1 بر روی ناقلین، مخازن و بیماران به منظور تعیین بروز و شیوع انواع لیشمانیوز جلدی و احشایی در کانونهای مهم و اندمیک ایران از جمله استانهای فارس، دامغان، البرز، گلستان انجام دادند و حتی موفق شدند برای اولین بار برخی ناقلین و مخازن قطعی این بیماری را در کشور مشخص نمایند (۳۲-۳۸). لیشمانیوز جلدی بیماری خودمحدود شونده ای است که معمولاً بعد از چند ماه و گاهی بیش از یکسال بهبود می یابد و ایمنی پایدار ایجاد می شود. اشکال بالینی آن از فرم خفیف تا فرم های تپیک با زخم های وسیع دهانه آتشفشانی شکل و همچنین فرم های آپتیک از قبیل لوپوئید، اسپوروتریکوئید، زوستری فرم، زونایی فرم و زگیلی فرم متفاوت است. تفاوت تظاهرات بالینی لیشمانیوز جلدی به گونه و سویه انگل، پاسخ ایمنی افراد و ژنتیک میزبان مرتبط می باشد. علیه انگل های لیشمانیا هر دو بازوی ایمنی یعنی هومورال و CMI عمل می کنند که نقش عمده با CMI است. پاسخ CMI در مقابل انگل های لیشمانیا عمدتاً از طریق سلول های T helper (Th) می باشد. سلول های Th از نظر عملکرد به Th1 و Th2 تقسیم می شوند. سلول های Th1 بر اثر تحریک، سیتوکاین هایی نظیر اینترلوکین-۲ (IL-2) و اینترفرون-گاما (IFN- γ) ترشح می کنند که موجب فعال شدن ماکروفاژها و از بین بردن میکروارگانیسم ها می شود ولی سلول های Th2 بر اثر تحریک سیتوکاینهایی نظیر IL-4، IL-5 و IL-10 ترشح می کنند که موجب فعال شدن ایمنی هومورال و فعال شدن سلول های B می شود گرچه همه فاکتورهای موثر در سوق دادن پاسخ های سیتوکاینی به سمت Th1 و Th2 هنوز کاملاً شناسایی نشده و مکانیسم دقیق آن روشن نیست، اما مطالعات انجام شده نشان می دهد که عواملی مانند ماهیت آنتی ژن، رده سلولی عرضه کننده آنتی ژن، خود سیتوکاین ها و حضور انواع مختلف مولکول های کمکی به صورت محلول یا چسبیده به غشاء در نتیجه نهایی پاسخ موثر می باشند (۱۲۲-۱۲۵).

مدل های موشی لیشمانیوز پوستی واضح ترین و شناخته شده ترین مثال برای الگوهای سیتوکاینی Th1 و Th2 بوده و امکان آنالیز اعمال زیر جمعیت های مختلف سلول های T را فراهم آورده اند (۱۳۳، ۱۳۲). عمده دانش بشر در مورد Th1 و Th2 از مطالعه بر روی این مدل ها به دست آمده است. سایتوکاینها، مولکولهای موثری در ایمنی سلولی هستند و در این میان ژن اینترلوکین ۴، نقش تعیین کننده ای در ایمنی زایی و میزان وفور انگل در بدن میزبان دارد. وزن ملکولی IL-4، ۲۰ KD می باشد که یک فاکتور رشد و تمایز سلولهای B است و در سنتز آنتی بادی به

وسیله این سلولها موثر است. در ضمن اینترلوکین ۴ به عنوان فاکتور رشد autocrine برای T لنفوسیت های CD4+ می باشد و نیز یک فاکتور فعال کننده ماکروفاژهاست. ماکروفاژها که مکان اصلی تکثیر انگل هستند در مکانسیم کشندگی انگل های لیشرمانیا نیز نقش دارند. ماکروفاژها عرضه کننده آنتی ژن های انگل به سلول های ایمنی هستند و واسطه های التهابی متعددی از جمله سیتوکاین های TNF- α ، IL-1 ، IL-12 ، IL-6 ، IL-10 ، IL-18 ، IFN- γ و GM-CSF ترشح می کنند. در مدل موشی IL4 برای بروز پاسخ های مربوط به Th2 و IL12 و IFN- γ برای بروز پاسخ های مربوط به Th1 ضروری است. اطلاعات موجود نشان می دهد که ایجاد مقاومت یا حساسیت به عفونت *L. major* عمدتاً به تولید سیتوکاین های Th1 و Th2 بستگی دارد. IFN- γ با فعال سازی ماکروفاژ و در نتیجه از بین بردن انگل های داخل سلولی باعث کنترل بیماری می شود و حال آنکه IL-4 باعث تحریک تولید سلولهای Th2 و حساسیت به بیماری می شود در مورد انسان اثبات نقش IL-4 در بروز پاسخ Th2 قطعی نیست (۱۳۲-۱۳۳).

بر اساس مطالعات انجام شده توسط کمالی سروستانی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در استان فارس ، اختلاف معنی داری در فراوانی و فرکانس پلی مرفیسم T--> IL4-590C در بین بیماران که زخم آن ها خود بخود بهبود پیدا کرده بود با افراد سالم و بدون زخم وجود داشت. مطالعات وی نشان داد که واریانتهای ژنتیکی در پروموتور IL4 می تواند خطر توسعه ابتلا به زخم و شدت و حدت زخم لیشرمانیوز را تحت تاثیر قرار دهد (۱۲۶). بر اساس جستجو در بانک های اطلاعاتی قابل دسترس، مطالعات محدودی در این زمینه انجام شده است .

با عنایت به موارد ذکر شده این رساله دکترای تخصصی اولین مطالعه جامع مولکولی در خصوص حلقه های اپیدمیولوژیک لیشرمانیوز جلدی شامل ناقلین ، مخازن ، عفونت انسانی و نقش پلی مرفیسم اینترلوکین ۴ در سیمای کلینیکی بیماران در کانون اندمیک بیماری در شهرستان اسفراین ، استان خراسان شمالی می باشد. این رساله با اهداف زیر بررسی شده است.

اهداف اصلی:

- ۱- تعیین آلودگی به انگل لیشمانیا در ناقلین، مخازن و بیماران به روش مولکولی در شهرستان اسفراین، استان خراسان شمالی
- ۲- تعیین پلی مورفیسم در پروموتر IL-4 در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی به روش مولکولی در شهرستان اسفراین، استان خراسان شمالی

اهداف فرعی:

- ۱- تعیین آلودگی به انگل لیشمانیا در ناقلین، مخازن و بیماران به روش مولکولی بر حسب ژن های هدف
- ۲- تعیین همسانی مولکولی انگل های جدا شده از ناقلین، مخازن و انسان بر حسب ژن های هدف
- ۳- تعیین پلی مورفیسم پروموتر IL-4 در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی بر حسب تظاهرات بالینی

هدف کاربردی:

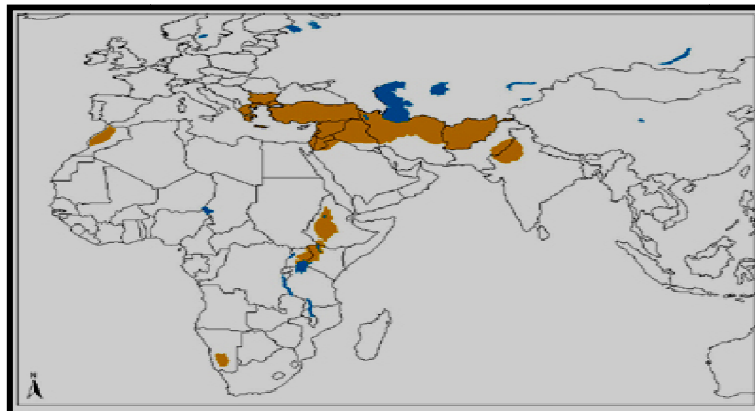
افزایش دانش در مورد شناسه مولکولی انگل های لیشمانیای شایع در کانون اندمیک اسفراین و بهره برداری از نتایج آن به منظور تدوین برنامه پیشنهادی کنترل و مبارزه با لیشمانیوز جلدی

سوالات پژوهش:

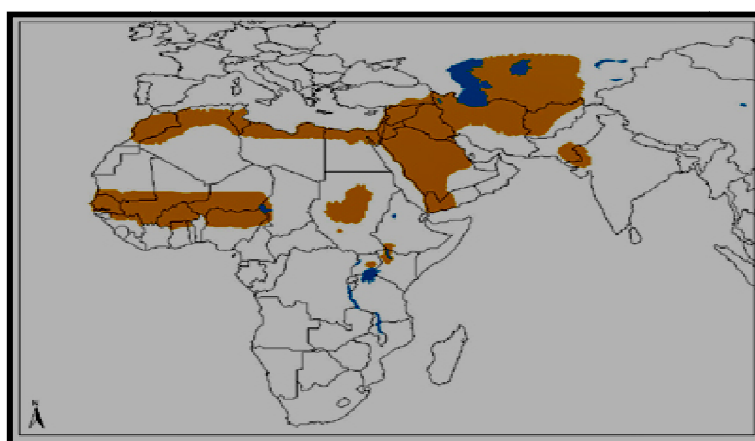
- ۱- ناقل یا ناقلین لیشمانیوز جلدی در شهرستان اسفراین کدامند؟
- ۲- مخزن یا مخازن لیشمانوز جلدی شهرستان اسفراین کدامند؟
- ۳- همسانی انگل های شناسایی شده در ناقلین، جوندگان و انسان چگونه است؟
- ۴- الگوی پلی مورفیسم پروموتر IL-4 در بیماران لیشمانیوز جلدی چگونه است؟

۱-۲: کلیات و مرور مطالب

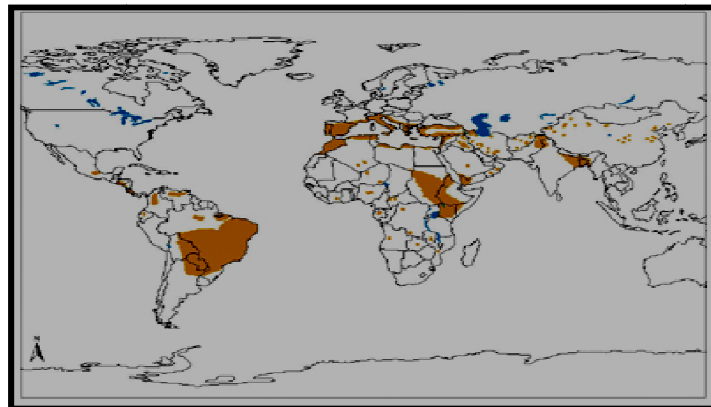
لیشمانیوز، هنوز یکی از فراموش شده ترین بیماریهاست که فقیرترین افراد جامعه، به خصوص در کشورهای در حال توسعه را تحت تأثیر قرار داده است. برآورد می شود که ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر آن بوده و حدود ۲ میلیون نفر موارد جدید هر ساله به آن مبتلا می شوند که حدود یک و نیم میلیون آن از نوع جلدی و بقیه از نوع احشایی می باشد (۴، ۵). این بیماری بوسیله تک یاخته های تاژکدار داخل سلولی جنس لیشمانیا ایجاد می شود و جزء ۱۰ بیماری مهم از نظر WHO می باشد (۵). لیشمانیوزها توسط گونه های بخصوصی از پشه خاکی های ماده به انسان منتقل می شوند و در چهار قاره بجز استرالیا وجود دارد. این بیماری در حال حاضر در ۹۸ کشور جهان وجود دارد (شکل های ۱-۱ تا ۱-۳) و در منطقه ای با توپوگرافی خیلی متفاوت شایع است (۴، ۵، ۶).



شکل ۱-۱: پراکندگی جغرافیایی لیشمانیوز جلدی ایجاد شده به وسیله گونه های *L. tropica* و *L. aethiopica* در دنیای قدیم (WHO، ۲۰۱۰)



شکل ۱-۲: پراکندگی جغرافیایی لیشمانیوز جلدی ایجاد شده به وسیله گونه *L. major* در دنیای قدیم (WHO، ۲۰۱۰)



شکل ۱-۳: پراکندگی جغرافیایی لیشمانیوز احشایی در دنیای قدیم و جدید (WHO، ۲۰۱۰)

بیماری لیشمانیوز به ۴ فرم جلدی (*Cutaneous Leishmaniasis=CL*)، جلدی مخاطی (*Mucocutaneous leishmaniasis=MCL*)، جلدی منتشره (*Diffuse Cutaneous*)، (*leishmaniasis=DCL*) و احشایی (*Visceral leishmaniasis=VL*) دیده می شود (۷، ۸، ۹).

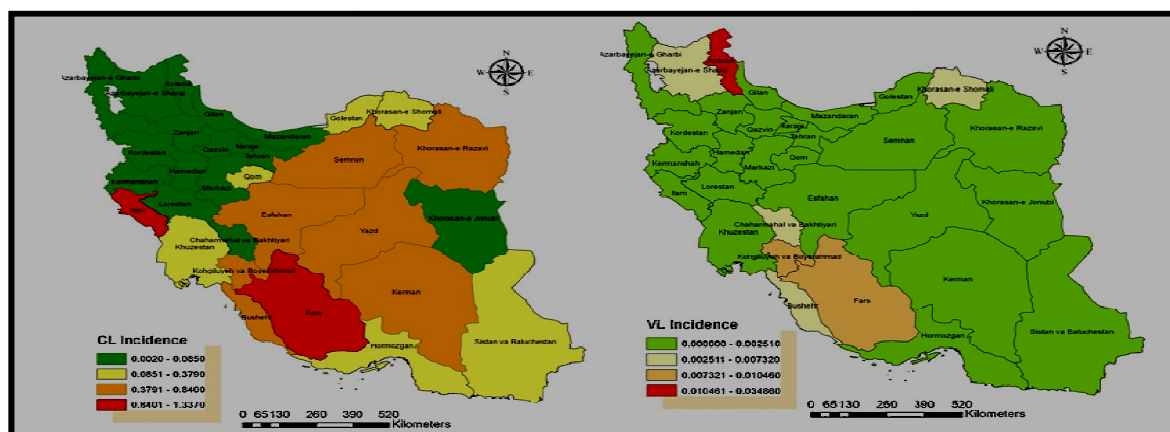
بیش از ۹۰٪ موارد جلدی از کشورهای ایران، افغانستان، سوریه، عربستان سعودی، برزیل و پرو گزارش می شود و از ۵۰۰۰۰۰ مورد لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)، بیش از ۹۰٪ آن مربوط به کشورهای هندوستان، نپال، بنگلادش، جنوب سودان و شمال شرقی برزیل می باشد (۴). لیشمانیوز جلدی یک بیماری زنونوز قابل پیشگیری است که توسط گونه های مختلف انگل لیشمانیا ایجاد شده و توسط گونه های مختلف پشه خاکی های ماده فلبوتومینه به انسان منتقل می شود. این بیماری از زمان های بسیار دور در ایران وجود داشته و امروزه کشور ما یکی از کانون های مهم این بیماری در جهان محسوب می شود.

در کشور ما *L. tropica* عامل لیشمانیوز جلدی شهری و *L. major* عامل لیشمانیوز جلدی روستایی است. نوع شهری این بیماری در تهران، مشهد، یزد، شیراز، کرمان، سبزوار، قم، کاشان، زاهدان، میرجاوه، نیشابور و بم به

صورت بومی وجود دارد و نوع روستایی آن در قسمت های شمال و شمال شرق اصفهان، ترکمن صحرا، گنبد، سرخس، اسفراین، خوزستان، ایلام، بوشهر و هرمزگان، دامغان، فارس و ... دیده می شود (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵).

ایران با بالاترین میزان بروز ZCL در شمار کشورهای است که عفونت با لیشمانیا مازور در بعضی مناطق آن به شکل آندمیک مشاهده می گردد (۱). آمار ثبت شده مبتلایان به فرم جلدی در کشور ما سالیانه حدود ۲۰ هزار نفر است در حالی که ارقام واقعی بیماری چندین برابر این تعداد می باشد و بعد از مالاریا از مهم ترین بیماری های انگلی در ایران به شمار می رود (۱۶).

از سال ۱۳۷۲ به بعد انتشار لیشمانیوز توسعه پیدا کرده است و یک افزایش چشم گیری در تعداد موارد گزارش شده وجود دارد. در کشور ما کانون های متعددی از لیشمانیوز جلدی وجود دارد و هر ساله تعدادی از هموطنان ما به این بیماری مبتلا می شوند (۱). شیوع لیشمانیوز جلدی در ایران رو به افزایش است و استانهای نظیر ایلام، یزد و بوشهر دارای بالاترین موارد جدید در سالهای اخیر بوده اند. به طور کلی استانهای مثل بوشهر، یزد، خراسان، فارس، ایلام، خوزستان و اصفهان با متوسط ۱۶۶ مورد در صد هزار نفر بالاترین میزان بروز بیماری در کشور را داشته اند. میانگین بروز لیشمانیوز جلدی و احشایی طی سالهای ۱۳۸۰ تا ۱۳۹۰ در نقشه های شکل ۱-۴ نشان داده شده است. از کانون های مهم لیشمانیوز جلدی روستایی ایران می توان به نطنز، نیک آباد و اردستان در استان اصفهان، اردکان در استان یزد، سبزوار و اسفراین در استان خراسان رضوی، ترکمن صحرا در استان گلستان، ارسنجان، نیریز و مرودمشت در استان فارس، جنوب استان سیستان و بلوچستان، ابردژ و ارمین و همچنین استان ایلام اشاره کرد (۱۱، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱).



شکل ۱-۴: میانگین بروز لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران، سال ۱۳۸۰ تا ۱۳۹۰ (Karimi و همکاران، ۲۰۱۴)

تاریخچه بیماری لیشمانیوز

با شروع قرن نوزدهم، Vianna, Lindenberg, Wright, Donovan, Leishman, Borovsky و Cunningham به صورت مستقل از هم و به طور جداگانه انگلی را تشخیص دادند که سبب بیماری لیشمانیوز می شود که توسط Ronald Ross، لیشمانیا نام گرفت. در ۱۹۰۴، Cathoire و Laveran انگل لیشمانیا را در طحال کودکان مبتلا به آنمی پیدا کردند. Nicolle نام این انگل را *L. infantum* نامید که در سال ۱۹۰۸ مخزن آن را در تونس، سگ نامید و توانست آن را در محیط آزمایشگاهی کشت نماید (۵).

در سال ۱۹۱۲، در برزیل، لیشمانیا را در زخم های جلدی مخاطی گزارش نمودند و در سال ۱۹۱۴ توسط محققین روسی، Yakimoff و Shakor انگل هایی را گزارش نمودند که سبب لیشمانیوز جلدی در آسیای مرکزی می شدند (۵). مردم مشرق زمین لیشمانیوز را از سالیان قدیم شناخته و در کتب علمی خود به اسامی

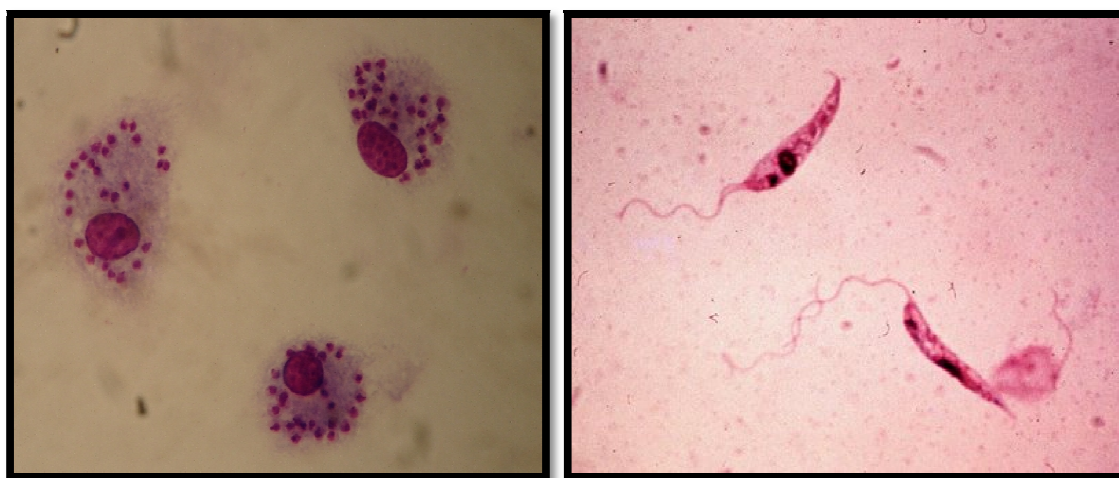
گونناگونی از آن یاد کرده اند. دانشمندان مغرب زمین اگرچه در سرزمین خودشان نیز این بیماری ها را داشتند ولی چون بیماری را اولین بار در کشورهای خاورمیانه مشاهده کرده اند، به حق اسم زخم خاوری یا دگمه شرقی را به آن داده اند. ابوعلی سینا در قرن یازدهم میلادی (۴۲۸-۳۷۳ ه.ق) در کتاب قانون از زخمی بنام جیرونیه یا خیرونیه سخن گفته است. زخمی که مدت ها به طول انجامیده و درمان آن دشوار بوده است. نشانه های این زخم که در برابر داروهای گوناگون آن زمان مقاومت داشته مانند سالک امروزی بوده است (۹). در سال ۱۹۰۰ دانشمندی به نام Leishman در طحال سربازی که از تب Dum Dum در هندوستان فوت کرده بود اجسام بیضی شکل را در داخل سلول های بزرگی مشاهده نمود. در سال ۱۹۰۳، Donovan در هندوستان در گسترش طحال بیمار مبتلا به کالآآزار همان اجسام گرد و کوچک را مشاهده و گزارش هایی برای Laveran و Mesnil فرستاد و آنان به افتخار دنووان، عامل بیماری را *Piroplasma donovani* نامیده و نام لیشمانیا دنووانی را به عنوان عامل بیماری کالآآزار پیشنهاد کردند. یک سال بعد Rogers در کلکته لیشمانیا را در محیط کشت نگهداری و جسم تاژک دار انگل را مشاهده نمود. در سال ۱۹۰۶، Blanchard فرانسوی اشاره کرد که بین عامل بیماری دگمه شرقی و کالآآزار تفاوتی وجود ندارد. در سال ۱۹۱۵، Sergan برای اولین بار به طور تجربی پشه خاکی جنس فلبوتوموس را ناقل لیشمانیا دانست. در سال ۱۹۲۴، Vand و همکاران از هامستر به عنوان بهترین حیوان حساس برای مطالعات تجربی و ایجاد بیماری در آزمایشگاه استفاده نمودند. بیماری لیشمانیوز جلدی از قدیم در ایران شناخته شده و از آن به عنوان پشه گزیدگی و یا سالک یاد کرده اند. ایرانیان آن زمان با ناقل و دوره بیماری آشنایی داشته اند. نام پشه گزیدگی نشانگر شناخت ناقل بیماری بوده و همچنین "سالک" یا «یک سال» نشانگر شناخت دوره بیماری بوده است. در شرح اسباب ملانفیس نیز از بیماری شیلیم یاد شده که تظاهرات آن به زخم سالک شبیه می باشد.

Neligan در سال ۱۹۱۳، متوجه شد که سگ های ولگرد اطراف تهران مبتلا به زخم پوستی هستند و در احشاء نیز ضایعاتی دارند. از این تاریخ سرایت بیماری از سگ به انسان مورد توجه قرار گرفت. در سال ۱۳۲۸ اولین گزارش از یک بیماری کالآزار در ایران توسط دکتر یحیی پویا از شمال ایران ارائه شد. از سال ۱۳۲۰ به بعد محققان ایرانی نظیر دکتر انصاری، دکتر مفیدی، دکتر ندیم، دکتر مثقالی، دکتر جوادیان، دکتر فقیه و دکتر حاجیان در زمینه اپیدمیولوژی، اختصاصات آزمایشگاهی انگل، گونه های پشه خاکی های مناطق آلوده و درمان موارد لیشمانیوز مطالعاتی انجام داده و دکتر مصطفی حبیبی و دکتر محمدعلی ملکی در زمینه آسیب شناسی، اشکال بالینی و درمان لیشمانیوز جلدی اقداماتی انجام دادند (۲۲،۹). در سالهای اخیر مطالعات فراوانی در زمینه انتشار پشه خاکی ها، گونه های ناقل بیماری، مخازن بیماری و همچنین فرم های مختلف بیماری و محل های انتشار آنها در استان های مختلف کشور انجام شده است (۱۱-۲۳، ۱۴-۴۷)

انگل لیشمانیا (*Leishmania*)

انگل های لیشمانیا، تک یاخته هایی هستند که به دو شکل تاژک دار و بدون تاژک وجود داشته و سبب بیماری در بعضی از خزندگان، جوندگان و پستانداران از جمله انسان می شوند. شکل آماستیگوت این انگل، بیضی شکل و طول آن بین ۲ تا ۵ میکرون می باشد. محل زندگی و تکثیر این انگل در داخل سلولهای بیگانه خوار تک هسته ای بوده و به صورت تقسیم دو تایی افزایش پیدا می کند. در صورت رنگ آمیزی با گیمسا و رایت، سیتوپلاسم به صورت آبی رنگ پریده و هسته قرمز و کیتوپلاست آن قرمز تیره یا بنفش رنگ پریده دیده می شود. شکل تاژک دار (پروماستیگوت یا لپتوموناد)، دارای طول ۱۵ تا ۳۵ میکرون و قطر ۲ تا ۴ میکرون داشته و طول تاژک آن ۱۵ تا ۴۰ میکرون است (شکل ۱-۵). این شکل انگل متحرک و دارای حرکت سریع و رشد آن به صورت تقسیم دوتایی است. این انگل در شکم حشره ناقل و محیط کشت مناسب آزمایشگاهی مشاهده می شود. شکل تاژکدار

متاسیکلیک که دارای تاژکی بلند و اندامی کوچک دارد، ابتدا در محیط کشت و سپس در بدن پشه خاکی ناقل به وسیله پادتن های تک دودمانی نشان داده شد. این شکل انگل، در بدن پشه خاکی، به دیواره دستگاه گوارش متصل نبوده و به سرعت حرکت می کند و دارای قدرت بیماری زایی در مهره داران است و از مشخصات آن، عدم آگلوتینه شدن آن با لکترین گرفته شده از بادام کوهی می باشد (۹).



شکل ۱-۵: سمت راست پروماستیگوت های تاژک دار، سمت چپ آماستیگوت های داخل سلولی (۹).

طبقه بندی انگل لیشمانیا

برای طبقه بندی لیشمانیا دو نوع شاخص داخلی و خارجی در نظر گرفته می شوند

شاخص های خارجی شامل موارد زیر هستند (۹):

الف) شاخص های اپیدمیولوژیک: شامل مطالعه روی رفتار، تنوع، پراکندگی و شرایط اکولوژیک ناقلین و مطالعه بر روی مخازن مختلف انگل، انتشار جغرافیایی یا شرایط اقلیمی و توپوگرافی منطقه می باشد (۹).

ب) مشاهدات بیولوژیکی: شامل خصوصیات انگل می باشد. به عنوان مثال در گونه های زیر جنس *Leishmania*، تکثیر انگل در پشه خاکی محدود به قسمت های قدامی دریچه پیلور می باشد (Suprappylaria) در حالی که گونه های زیر جنس *Viannia* تکثیر انگل ابتدا در روده عقبی پشه خاکی ناقل انجام شده و سپس به مناطق جلوتر در روده میانی ناقل مهاجرت می کند (Peripylaria). گروه دیگری از لیشمانیاها که انگل خزندگان محسوب می شوند، تکثیر انگل در قسمت های خلفی تر روده پشه خاکی انجام می شود، به طوری که انتقال انگل از طریق بلع آن توسط جانور خزنده صورت می گیرد (Hypopylaria) (۹).

ج) ملاحظات بالینی: شامل بررسی اشکال مختلف ضایعه های بوجود آمده توسط انگل لیشمانیا است که تاکنون در مورد لیشمانیوز جلدی، لیشمانیوز جلدی منتشره، لیشمانیوز جلدی-مخاطی و لیشمانیوز احشایی، این اشکال و صور شناسایی شده اند (۹).

شاخص های داخلی شامل موارد زیر هستند:

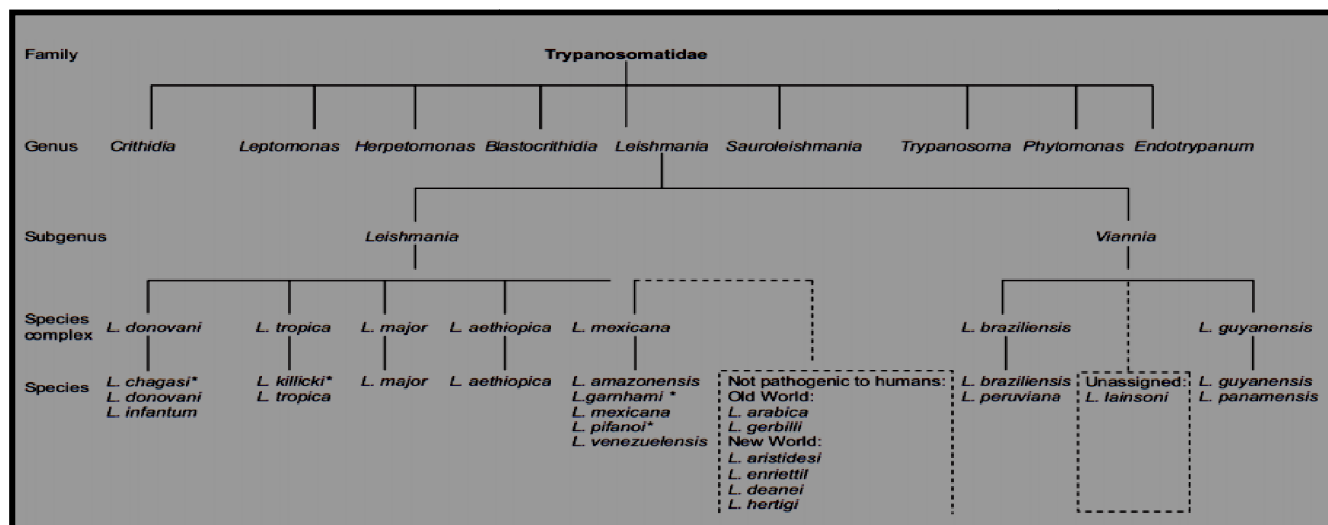
الف) شاخص های بیوشیمیایی و مولکولی: شامل تفکیک و جداسازی انگل از طریق Zymodeme می باشد. آنزیم های سلولی که در اشکال فضایی و ساختمانهای مختلف مولکولی انگل، سنتز می شوند از طریق مطالعه ایزوآنزیم های مختلف به روش الکتروفورز قابل تفکیک هستند. امروزه از یک روش نوین الکتروفورزی به نام Pulsed Field Gel Electrophoresis استفاده می کنند. روش نامبرده با استفاده از دو میدان الکتریکی

مقطعات می تواند مولکول های بزرگ DNA در Mega Base را از هم تفکیک نماید. به کمک این روش می توان تعداد کروموزوم ها و اندازه آنها در تک یاخته ها را مشخص نمود.

(ب) آنزیم های اندونوکلاز محدودالانر برای DNA مربوط به کینتوپلاست (kDNA): در این روش با بدست آوردن الگوهای قطعات بدست آمده می توان آنها را شناسایی و طبقه بندی نمود.

(ج) شاخص های ایمونولوژیک و سرولوژیک: در این روش، فاکتورهای مترشحه آنتی ژنیک انگل را با آنتی بادی های ضد پروماستیگوت بدست آمده از خرگوش های هیپرایمیون مقابل کرده و تفاوت های سروتایی و خصوصیات ایمونولوژیک آنها را با هم مقایسه کرده و بهترین نوع آنتی بادی ها، آنتی بادی مونوکلونالی است که بر ضد آنتی ژن های غشای پروماستیگوت به طور اختصاصی عمل می کند (۹، ۴۸).

بر اساس مطالب ارائه شده، مبنای طبقه بندی جدید که در سال ۱۹۸۸ توسط سازمان جهانی بهداشت ارائه شد بر اساس نام دانشمندان Leishman و Vianna که در شرق و غرب دنیا اولین کاشفین عوامل لیشمانیوز دنیای قدیم و جدید بودند، می باشد که بر این اساس، جنس لیشمانیا را با قرار دادن در دو زیر جنس *Leishmania* و *Viannia* به صورت شکل ۱-۶ طبقه بندی می کنند (۵).



شکل ۱-۶: طبقه بندی انگل های لیشمانیا و گونه های شناخته شده آن. بیماریزایی گونه هایی که با نقطه چین مشخص شده اند، هنوز تأیید نشده است (Banuls و همکاران، ۲۰۰۷).

چرخه زندگی انگل لیشمانیا

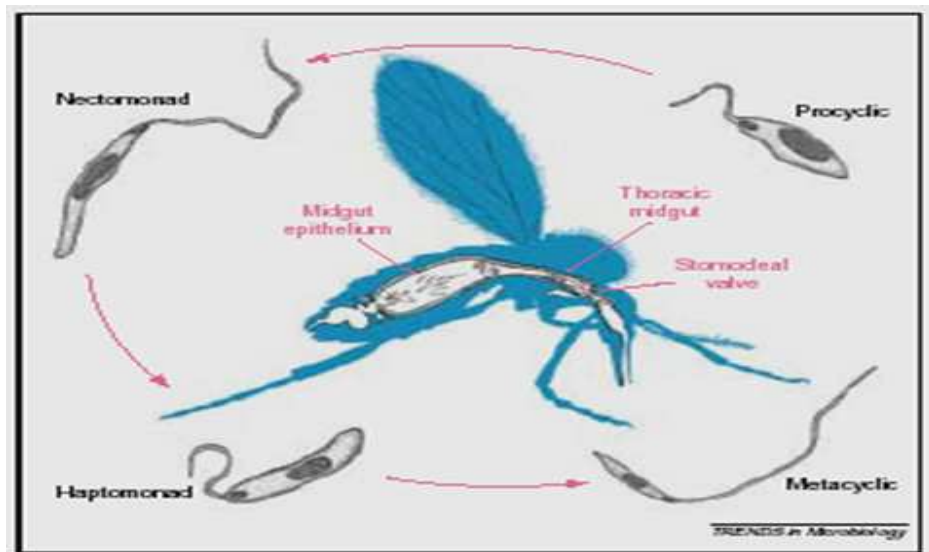
هنگام خونخواری پشه خاکی ماده از میزبان آلوده به انگل لیشمانیا، شکل آماستیگوت انگل وارد روده حشره می شود. این فرم انگل در بدن پشه خاکی، به دلیل کاهش درجه حرارت، به فرم لپتومونایی تبدیل می شود و سپس به روش دوتایی تقسیم شده و پس از اینکه به تعداد فراوان تکثیر پیدا کرد، وارد مری و حلق پشه خاکی می شود. مدت زمان لازم برای این عمل بسته به درجه حرارت و رطوبت محیط متغیر بوده و حداقل از یک هفته تا ۱۸ روز طول می کشد تا اجسام لپتومونایی در بدن پشه خاکی آلوده برای تزریق به میزبان جدید آماده گردد. پشه خاکی آلوده در هنگام گزش میزبان جدید، فرم متاسیکلیک لپتومونایی را به بدن او تلقیح می کند و به دلیل بالا رفتن درجه حرارت، انگل دوباره به جسم لیشمن تبدیل می گردد و این چرخه همچنان ادامه می یابد (۴۸). لازم به یادآوری است که در معده پشه خاکی پروماستیگوت های انگل لیشمانیا به ۴ فرم دیده می شوند که عبارتند از: (شکل ۱-۷)

۱- **نکتوموناد:** شکل دوکی انگل است که دارای ۱۲ میکرون طول بوده و دارای کینتوپلاست مشخص و طول تاژک ۱۲ تا ۲۰ میکرون دارد که از جلوی انگل منشاء می گیرد. این فرم انگل به خاطر محتوای ریبوزومی بالا، دارای چگالی بیشتری نسبت به اشکال لپتوموناد است.

۲- **هپتوموناد:** این فرم انگل، چاق، کوتاه و دارای چگالی کمتری است و از طریق تاژک تغییر یافته به جدار معده میانی می چسبد. در این شکل، کینتوپلاست در بخش جلویی انگل قرار داشته و طول تاژک آن بیش از ۱۵ میکرون نمی باشد.

۳- **پاراماسیتیگوت:** در این فرم، کینتوپلاست در کنار هسته قرار دارد. حفره تاژکی بسیار عمیق بوده و شکل کلی انگل تخم مرغی یا گرد می باشد و اندازه آن ۱۰ تا ۵۰ میکرون می باشد و به علت کوتاه بودن تاژک (۱۰ تا ۱۵ میکرون)، تحرک آن خیلی کم می باشد.

۴- **متاسیکلیک:** اشکال کوچک و آزاد انگل به طول ۱۰ میکرون و تاژک بلند ۲۰ میکرون فرم آلوده کننده انگل را تشکیل می دهند (۷، ۹، ۴۹-۵۱).



شکل ۱-۷: اشکال مختلف انگل در معده پشه خاکی

ساختمان ژنوم انگل لیثمانیا

الف - ژنوم هسته (nDNA): پروژه ژنوم *L. major* در سال ۱۹۹۴ آغاز و با موفقیت به پایان رسید و اندازه آن ۳۲/۸ Mb بر آورد شده که در ۳۶ جفت کروموزوم توزیع شده است. گونه های لیثمانیای دنیای قدیم ۳۶ جفت کروموزوم (۲/۸-۰/۲۸ Mb) و گونه های لیثمانیای دنیای جدید ۳۴ یا ۳۵ کروموزوم دارند که در گروه *L. mexicana* کروموزوم های ۸، ۲۹، ۲۰ و ۳۶ و در گروه *L. braziliensis* کروموزوم های ۲۰ و ۳۴ با هم ادغام شده اند (۵۲، ۵۳).

این کروموزوم ها طول ۴۰۰-۲۰۰ kb، تلومر داشته اما فاقد سانترومراند. در ژنوم *L. major* ۹۱۱ ژن RNA، ۳۹ ژن کاذب و ۸۲۷۲ ژن کد کننده پروتئین شناسایی شده اند. محتوی C+G ژنوم ۵۹/۷ درصد است. ژن های لیثمانیا آرایش متوالی Tandem Array و یا حداقل در تمام ژنوم، دو یا چند کپی از آن ژن حضور دارد. آنالیز سکونس تراکم یک ژن را ۳/۵ kb اعلام می نماید. مطالعات قبلی نشان داده است که ۳۰٪ از ژنوم لیثمانیا مرکب

از اجزای تکراری، بیش از ۵۰٪ آن تکرارهایی از تلومر / ساب تلومر و بقیه آن ژنهای تکراری و توالی های ساده تکراری می باشد. اولین مقایسه ژنوم لیشمانیا ثابت کرد که نحوه آرایش ژنی، در ۳۰ گونه کاملاً حفاظت شده است. اگر چه فواصل بین ژنی کاملاً متفاوت است بنابراین پلی مورفیسم زیادی در توالی اسیدهای نوکلئیک وجود دارد. در بعضی از مطالعات کروموزوم های لیشمانیا دیپلوئید و در بعضی دیگر آنوپلوئید تصور شده اند. تا اواسط دهه ۱۹۹۰ لیشمانیا موجوداتی آنوپلوئید فرض می شدند اما هم اکنون دیپلوئیدی آنها کاملاً پذیرفته شده است (۵۳، ۵۴).

سطوح پلوئیدی لیشمانیا هنوز مورد بحث است چرا که بیان می کنند که تکثیر ژن حادثه مهمی است که لیشمانیا را از تأثیر سموم سلولی و یا فشارهای محیطی باز می دارد. با این وجود Cruz و همکاران بیان می کنند که این رویداد لیشمانیا را به موجودی آنوپلوئید اختیاری یا گذرا تبدیل نموده است (۵۵). در تریپانوزوماتیدها، سه RNA پلیمراز کلاسیک (I, II, III) وجود دارد اما با این حال در لیشمانیا ترکیبی از مکانیزم های بیان ژن غیر معمول یافت شده است. در لیشمانیا همانند سایر تریپانوزوماتیدها، رونویسی ژن به صورت پلی سیستمیک بوده و پروسه های اتصال و پلی آدنیلایسون بعداً صورت می گیرد. همچنین در پروتئین های لیشمانیا تغییرات مهمی چون فسفریلاسیون، گلیکولیزاسیون و لپیداسیون نیز به منظور استقرار و یا فعال سازی صورت می گیرد. بعضی از تغییرات اساسی پروتئین ها مانند اضافه شدن گلیکوفسفاتییدیل اینوزیتول (GPI)، آسیلاسیون و پرنیلاسیون ضروری می نماید چرا که همه آنها اتصال پروتئین به غشاء و یا بر هم کنش پروتئین - پروتئین را تسهیل می کند (۵۶، ۵۷).

ب- Kinetoplast DNA (kDNA): این نوع DNA، میتوکندریایی راسته کینتوپلاستیدا می باشد که ۱۰ تا ۲۰ درصد تمامی DNA انگل را شامل می شود (۵۸). کینتوپلاست از نظر میکروسکوپی به صورت دیسکی بر روی غشای میتوکندری، در قاعده تاژک قرار داشته و از حلقه های کوچک و بزرگ (Minicircles & Maxicircles) ساخته شده است. حلقه های بزرگ هموژن، به تعداد ۲۵ تا ۵۰ مولکول ۲۰Kbp و حلقه های

کوچک هتروژن بوده و به تعداد ۱۰۰۰۰ مولکول، حدود ۰/۸ Kbp به صورت شبکه ای به هم تابیده دیده می شوند. حلقه ها دارای دو قسمت ثابت و متغیر هستند. نواحی ثابت به طول ۱۲۰ جفت باز (bp) در تمامی گونه های لیثمانیا ثابت بوده و معیار تفکیک جنس لیثمانیا از سایر تریپانوزوماتیدها محسوب می شوند. نواحی متغیر دارای وزنی حدود ۶۰۰ تا ۸۰۰ جفت باز بوده و در گونه های مختلف انگل متفاوت هستند و می توانند در تفکیک گونه های لیثمانیا مورد استفاده قرار گیرند. این واقعیت سرعت تکاملی توالی های Minicircle را بیان می کند. نقش حلقه های بزرگ رونویسی نوکلئوتیدهای mRNA بیان شده است (Leon و همکاران، ۱۹۹۶). حلقه های کوچک نیز gRNA (RNA راهنما) را به منظور رونویسی mRNA زیر واحد سوم سیتوکروم اکسیداز کد می نمایند (۵۸). اخیراً در نواحی متغیر حلقه های کوچک لیثمانیا دونووانی یک لوکوس معرفی شده که به یک محصول پروتئینی رونویسی و ترجمه می شود (۵۹).

ج- rDNA: یکی از مفیدترین اجزای ژنوم هسته برای تعیین هویت گونه، خانواده های چند ژنی است که در داخل یک گونه یکنواختی نشان می دهند ولی در بین گونه ها متنوع می باشند. ژن rDNA نیز از این خانواده می باشد. ژن های مذکور از واحدهای تکرار شونده به نام Tandem Repeat تشکیل شده است که تعداد آن از ۱۰۰ تا ۵۰۰۰ تکرار در موجودات مختلف متغیر است. هر تکرار شامل مناطق 18S، 5.8S و 28S می باشد که توسط یک منطقه وسیع به نام فضای بین ژنی (Intergenic Spacer= IGS) از هم تفکیک می شوند. بخش های ترجمه شونده و یا کد کننده در داخل گونه به صورت حفاظت شده و با کمترین تغییر از نسلی به نسل دیگر به ارث می رسند. فضای بین بخش های ترجمه شونده یک (ITS1) بین ژن های 5.8S و 18S و فضای بین بخش های ترجمه شونده دو (ITS2) بین ژن های 5.8S و 28S قرار دارند. بر خلاف مناطق کد کننده، این مناطق غالباً در سطح بین گونه ای دارای تنوع طولی و توالی می باشند و برای تفکیک گونه ها از آنها استفاده می شود (۶۰، ۶۱).

لیشمانیوز جلدی روستایی (Zoonotic Cutaneous leishmaniasis = ZCL) در ایران

عامل بیماری، *L. major* و ناقل اصلی آن *P. (phlebotomus) papatasi* است که بیماری را به انسان و جوندگان منتقل می‌کند. علاوه بر این، *P. caucasicus*، *P. mongolensis* و *P. ansari* هم بیماری را در بین جوندگان انتقال می‌دهند (۹، ۲۱، ۴۰، ۶۲).

در حال حاضر کانون‌های مهم این بیماری شامل اصفهان، سرخس، ترکمن صحرا، لطف آباد، اسفراین، طبس، جاجرم، برداسکن در استان خراسان، دهلران، موسیان، عین خوش، دشت عباس و مهران در استان ایلام، شوشتر، دشت آزادگان، فکه، اهواز، دزفول در استان خوزستان، اصطهبانات در استان فارس، دامغان، شاهرود، بکران شاهرود در استان سمنان، بوشهر، ابردر ورامین، دشتیاری، کاشان، اردستان، بادرود، چاه افضل، چاهک (یزد) و بم می‌باشد (۹، ۱۲-۱۴، ۳۲-۳۷، ۶۲-۷۲). شکل ۱-۷.

مطالعات در سه کانون مهم استان فارس شامل ارسنجان و نی ریز و مرودشت حاکی از تغییرات وضعیت مخازن این بیماری بوده است، بطوریکه در این سه کانون برای اولین بار جونده *Meriones libycus* به عنوان مخزن اصلی بیماری گزارش شده است. در این کانونها گونه *Phlebotomus papatasi* به عنوان ناقل قطعی بیماری تعیین گردیده است (۱۲، ۱۳، ۳۲، ۷۲).

گونه *Phlebotomus papatasi* نقش اصلی را به عنوان ناقل ایفا کرده و دیگر پشه‌های حاکی‌ها شامل *P. caucasicus*، *P. mongolensis* و *P. alexandri* نقش ثانویه ایفا می‌کنند. در جنوب استان سیستان و بلوچستان علاوه بر فلپوتوموس پاپاتاسی گونه *P. salehi* نقش مهمی را در انتقال بیماری به عهده دارد (۷۳).

در مطالعات راثی و همکاران در منطقه شاهرود آلودگی به انگل *L.major* در دو گونه پشه خاکی شامل *P.papatasi* و *P. caucasicus* و چونده *Rhombomys opimus* به روش مولکولی به اثبات رسیده است (۳۴، ۱۵). شکل ۸-۱ کانون های بیماری لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران را نشان می دهد.



شکل ۸-۱: پراکندگی کانون های بیماری لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران (شیرزادی و همکاران، ۱۳۹۰)

مخازن لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران

این بیماری، یک زئونوز، یعنی شایع در بین حیوانات است و ابتلای انسان به طور معمول فرع بر آلودگی حیوانات است. بنابراین بیماری در جایی دیده می شود که اولاً "مخازن حیوانی بیماری به قدر کافی وجود داشته باشد، ثانیاً" پشه خاکی های ناقل نیز وفور کافی داشته باشند، ثالثاً" انسان به دلایلی در مجاورت حیوانات آلوده قرار بگیرد. نقش انسان به عنوان مخزن لیشمانیوز پوستی با عامل لیشمانیا ماژور خیلی کم است. به تازگی ثابت شده است که خون انسان از رشد انگل لیشمانیا ماژور در معده پشه خاکی ناقل جلوگیری می کند و انسان نمی تواند مخزن مناسبی برای انتقال این انگل باشد

حیوانات مخزن این بیماری بیشتر چونندگانی از نوع موشهای صحرایی از خانواده کریستیده (*Cricetidae*) و زیر خانواده ژربیلینه (*Gerbillinae*) هستند. تاکنون چهار گونه از این چونندگان به عنوان مخازن حیوانی اصلی این بیماری در کانون های گوناگون کشور ما شناخته شده است (۱۲-۱۴، ۳۲-۳۷، ۷۲-۸۱). شکل ۱-۹.

جریل بزرگ (*Rhombomys opimus*)

در کانون های مرکزی، شمال و شمال شرقی اصفهان، زواره تا نواحی شرقی بادرود، جنوب شرقی کاشان، سرخس، لطف آباد، ترکمن صحرا، اسفراین، جوین سبزوار، بکران و جاجرم، بجنورد، شاهرود، ابردژ ورامین، قسمتهایی از غرب اردکان، ابرکوه یزد، دامغان و بعضی کانون های کوچک دیگر این چونده مخزن اصلی بیماری است (۷۸، ۸۰). شکل ۱-۹.

مريونس ليبيکوس (*Meriones libycus*)

این جونده در کانون های اردستان، شمال غربی بادرود (نطنز)، بعضی از روستاهای غرب اردکان، نیریز، ارسنجان و مرودشت (استان فارس) مخزن اصلی بیماری است. آلودگی لیشمانیایی ناشی از آن در مناطق یاد شده به ترتیب ۷/۱، ۲۶، ۱۵/۷، ۳/۲ و ۶/۸ درصد گزارش شده است (۸۰). فعالیت مريونس ليبيکوس غالباً در روز است ولی گاهی در شب هم دیده می شود. لانه های خود را در زیر بوته ها یا کنار جویهای کشتزارها و در مناطق کویری حفر می کند (شکل ۱-۹). با توجه به اینکه مريونس ليبيکوس در اماکن مسکونی هم رفت و آمد می کند، درباره نقش آن در همه گیری لیشمانیوز پوستی روستایی در دیگر کانون های ایران باید مطالعه بیشتری انجام شود (۷۸، ۸۰).

جریل هندی (*Tatera indica*)

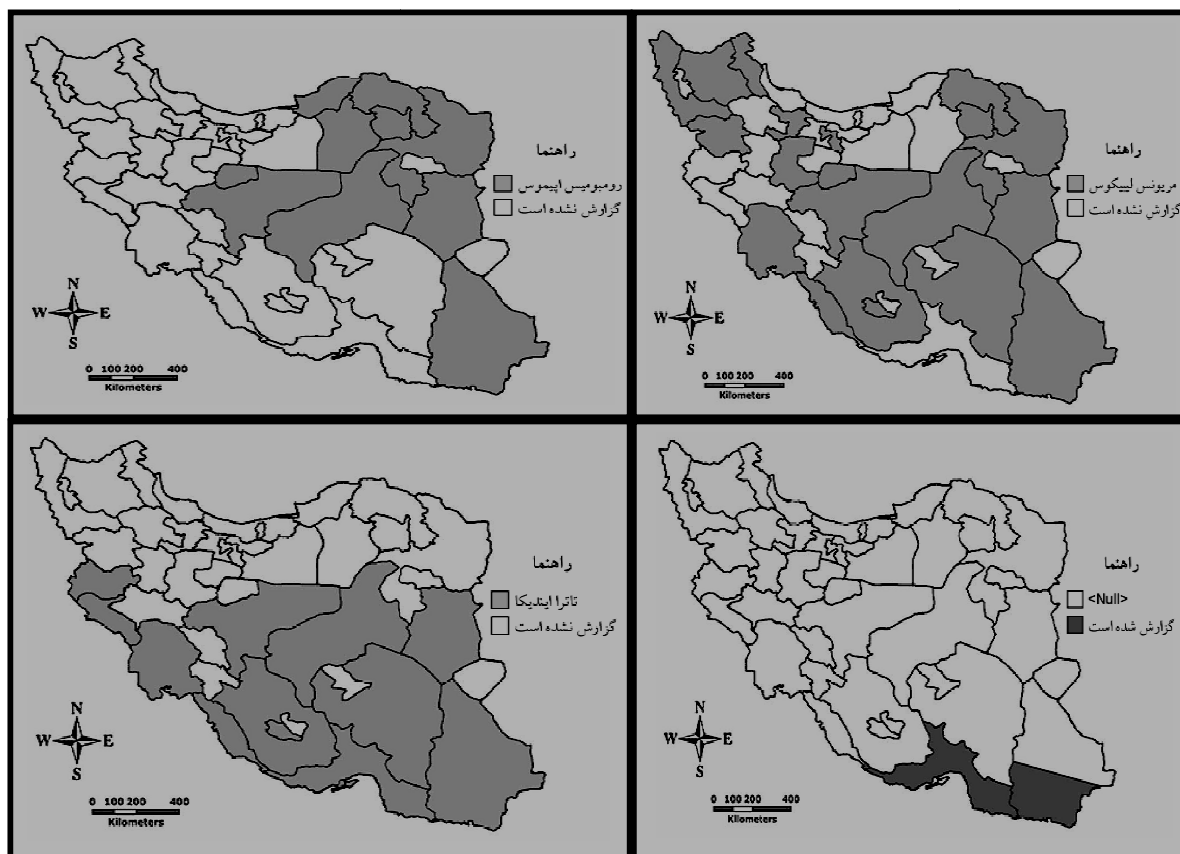
در کانون های جنوب غربی و جنوب شرقی دشت های ایلام و خوزستان (یعنی مناطق مرزی جنوبی ایران و عراق از سرپل ذهاب به جنوب، فکه، موسیان، عین خوش، مهران، دهلران، دشت عباس، دزفول، شوش، اهواز، آبادان و مناطقی دیگر) و بعضی از قسمت های دشت ساحلی منطقه بوشهر و هرمزگان، تاترا ایندیکا مخزن اصلی بیماری و گونه غالب است (شکل ۱-۹). هم چنین در خوزستان و ایلام نزوکیا ایندیکا و مريونس ليبيکوس آلوده گزارش شده است. تاترا ایندیکا شب فعال است و اغلب در نزدیکی کشتزارها و مجاورت محل زندگی انسان دیده می شود (۷۸، ۸۰).

مريونس هوریانه (*Meriones hurrianae*)

در کانون جنوب شرقی ایران یعنی منطقه دشتیاری بلوچستان از مرز ایران و پاکستان تا شهرهای چابهار، روستای تیس و منطقه کنارک مخزن حیوانی اصلی بیماری نوع دیگری از موش صحرایی است که مريونس هوریانه

نامیده می شود (شکل ۹-۱). این جونده روز فعال است و بیشتر در زمینهای نرم و شنی لانه می سازد. در شکل

۹-۱، پراکندگی مخازن لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران نشان داده شده است (۷۸، ۸۰).



شکل ۹-۱: نقشه های پراکندگی مخازن لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران (صداقت و صلاحی

مقدم، ۱۳۸۹)

حشره شناسی پشه خاکی ها

پشه خاکی ها در دوره Cretaceous و ۱۲۰ میلیون سال قبل ظاهر شده اند. ظهور این حشرات قبل از پستانداران بوده و از خزندگان تغذیه می کردند (۸۲). اولین گونه پشه خاکی در سال ۱۱۶۵ (ه.ش) به وسیله Scopoli شناسایی گردید و فلботوموس پاپاتاسی نامیده شد (۸۳). شناسایی این گروه از حشرات به عنوان پشه خاکی و با توجه به وضعیت سیستماتیک آنها اولین بار توسط Rondani در سال ۱۱۹۸ (ه.ش) انجام گرفت و همین شخص در سال ۱۲۱۹ (ه.ش) اولین جنس پشه های خاکی را به نام *Phlebotomus* معرفی نمود (۸۳). اولین مرور کلی در باره فون پشه خاکی های ایران توسط مثقالی در سال ۱۳۴۰ (ه.ش) انجام گردید و بعد از آن توسط محققین دیگر ادامه یافت (۶۲).

پشه خاکی های فلботومینه دوبالانی ظریف با پاهای بلند لوله ای شکل هستند. این حشرات در شش جنس قرار می گیرند که در دنیای قدیم ۸۵ گونه برای *Phlebotomus*، ۲۹۸ گونه برای *Sergentomyia*، یک گونه برای *Chinius* و در دنیای جدید ۳۵۰ گونه برای *Lutzomyia*، ۲۲ گونه برای *Brumptomyia* و ۶ گونه برای *Warileyia* مشخص شده است که در بین آنها فقط حدود ۸۱ گونه در انتقال بیماری به انسان نقش دارند. پشه های خاکی را می توان از روی نحوه قرار گرفتن بالهایشان در هنگام استراحت که شبیه به حرف V است، از سایر دوبالان به ویژه اعضای خانواده Psychodidae تشخیص داد. با انجام مطالعات سیتوژنتیک روی تعدادی از گونه های این حشرات، تعداد کروموزوم های این گروه از حشرات، $2n=6$ تا $2n=10$ مشخص شده است (۸۴، ۸۵).

فقط پشه خاکی های ماده خونخوارند و دو جنس *Phlebotomus* در دنیای قدیم و *Lutzomyia* در دنیای جدید دارای گونه هایی هستند که به عنوان مهمترین ناقلین در انتقال انواع لیشمانیوزها به انسان نقش دارند. پشه خاکی ها علاوه بر لیشمانیوز در انتقال تب پاپاتاسی یا تب سه روزه و بیماری کاریون یا تب اورویا به انسان نیز نقش

دارند. پشه خاکی ها، عمدتاً در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می شوند ولی تعداد محدودی از گونه ها در نواحی معتدله هر دو نیمکره نیز یافت می شوند. این حشرات در نیوزیلند و جزایر اقیانوس آرام وجود ندارند. در دنیای قدیم، پشه خاکی هایی که از انسان خونخواری می کنند، در نواحی گرمسیری وجود دارند. بر عکس، انتقال لیشمانیوز در دنیای جدید اصولاً در نواحی گرمسیری انجام می شود. این حشرات دارای زیستگاههای بسیار متنوع هستند که از سطح دریا گرفته تا ارتفاعات ۲۸۰۰ متری یا بیشتر در نواحی آند و اتیوپی و از بیابانهای گرم و خشک تا جلگه ها و درختستان های پراکنده و جنگل های بارانی متراکم وجود دارند. هر گونه از این حشرات دارای احتیاجات اکولوژیکی خاص خود است و عده معدودی از آنها نیز این شرایط را در اطراف اماکن زیست انسانی پیدا کرده اند. وضعیت کانونی بودن بیماری لیشمانیوز هم بدون شک به علت ویژگی های اکولوژیکی ناقل و احتمالاً به میزان کمتر مربوط به مخازن بیماری است (۸۴، ۸۵).

ارجحیت خونخواری از میزبان

بیشتر گونه های پشه خاکی میزبانهای ترجیحی محدودی دارند. اطلاعات در این رابطه به دو دلیل عمده چندان زیاد نیست:

- ۱- تعداد کم پشه خاکی های تازه خون خورده ۲-آنتی سرم های محدود جهت آنالیز خون خورده شده. انتخاب میزبان برای خونخواری، بسته به نوع پشه خاکی و فراهم بودن میزبان متفاوت بوده (۹۷) و به طور کلی انواع جنس *Sergentomyia* از خزندگان و بیشتر اعضای جنس های *Phlebotomus* و *Lutzomyia* از حیوانات خونگرم و بویژه پستانداران تغذیه می کنند (۸۴، ۸۶، ۸۷). این ویژگی عمومیت نداشته و به عنوان مثال در نواحی گرمسیری آفریقا و هندوستان بعضی از گونه های *Sergentomyia* از پستانداران و از جمله انسان تغذیه می کنند (۸۷) و یا در آسیای مرکزی نیز، با وجود اینکه اکثر انواع این جنس از مارمولکها تغذیه می کنند، گزارشاتی در

مورد خونخواری *Sergentomyia sintoni* از جوندگان و گاهی انسان وجود دارد. از طرف دیگر، هر چند که بسیاری از گونه های *Phlebotomus* عموماً از خون پستانداران تغذیه می کنند، گاهی خزندگان را نیز مورد تغذیه قرار می دهند که به عنوان مثال در این مورد *P.papatasi* را می توان نام برد که در ترکمنستان، از مارمولک ها نیز خونخواری می کند (۸۴، ۸۷).

بعضی از گونه های پشه خاکی کاملاً حیوان دوست می باشند مانند *Lu.flaviscutellata* در برزیل که فقط از جوندگان تغذیه می نماید، ولی اکثر گونه های *Phlebotomus* و *Lutzomyia* علاوه بر حیوانات از انسان نیز تغذیه می نمایند (۸۷). چندین گونه نیمه اهلی از جمله *P.papatasi*، *P.sergenti* و *Lu.longipalpis* که از پستانداران تغذیه می نمایند، به آسانی از ماکیان نیز خون می خورند (۸۴). در مطالعه ای که در این زمینه در مصر انجام گردیده، مشخص شده که از میان ۵۹۷ عدد *P.papatasi* ماده صید شده از اماکن داخلی، تعداد ۵۹۴ نمونه دارای خون انسان و سه نمونه دیگر دارای خون مخلوط (انسان و سگ، انسان و موش، انسان و مرغ) بوده اند. از ۵ نمونه پشه خاکی صید شده از اماکن خارجی، ۴ نمونه خون متعلق به انسان و نمونه دیگر متعلق به پرندگان بوده است. در مورد *P.langeroni* کلیه ۳۹ نمونه صید شده از اماکن داخلی و همچنین ۶ نمونه از ۱۰ عدد پشه خاکی صید شده از اماکن خارجی، دارای خون انسان بوده است (۸۸).

در مطالعه ای که روی ترجیح خونخواری *P. perfiliewi* در شمال غربی ایران انجام شده حدود ۳۰٪ پشه خاکی ها از خون انسان و بقیه از خون حیوان (سگ، گاو و...) و یا مخلوط خون انسان و حیوانات تغذیه نموده بودند (۸۹).

در مطالعه ای دیگر در هند، با بررسی درصد خونخواری *P.papatasi* و *P.argentipes* از روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان، نشان داده شده که گونه اولی، انسان را به سایر حیوانات ترجیح می دهد ولی

P. argentipes، تمایل خاصی به خونخواری از انسان ندارد که این موضوع انسان دوست بودن *P. papatasi* را تایید می نماید (۹۰).

در ایران با تشخیص خون های خورده شده ۵۷۵ عدد *P. papatasi* صید شده از یک منطقه روستایی مشخص گردیده که ۵۷/۵٪ آنها از پرندگان (عموماً مرغ و کبوتر) و ۴۲/۵٪ بقیه از پستانداران (شامل انسان، گاو، قاطر، گوسفند و بز) تغذیه نموده اند. بدین ترتیب نشان داده شده که این گونه پشه خاکی از لحاظ تغذیه ای فرصت طلب بوده و دارای طیف وسیعی از میزبانان مختلف می باشد. مطالعات انجام شده سالهای اخیر در مورد این گونه نیز توسط محققین دیگر انجام شده و نقش بیماریزایی آن کاملاً شناخته شده است (۱۲-۱۴، ۳۲-۳۷، ۴۰-۴۳، ۹۱-۹۵).

لازم به ذکر است که آلودگی های لیشمانیایی موجب اختلال در خونخواری می شوند ولی این اختلال نه تنها مانع انتقال انگل نمی شود بلکه بر انتقال تاثیر مثبت دارد. پشه خاکی هایی که آلوده نیستند ۲۴-۸ درصد در خونخواری موفق تر از پشه خاکی های آلوده هستند. پشه خاکی های آلوده جهت خونخواری کامل مجبور به چند بار گزش هستند که در هر مرتبه انتقال انگل انجام می شود. آزمایشها نشان داده است که یک نمونه *P. papatasi* که آلودگی طبیعی به لیشمانیا داشته است، ۲۶ مرتبه یک ناحیه با قطر ۲ سانتیمتر مربع را گزیده و ۱۲ روز بعد، ۱۱ زخم لیشمانیایی ایجاد شده است (۹).

اثر تغذیه از مواد گیاهی بر روی انگل های لیشمانیا

شهد خواری پشه خاکی ها از نظر رشد انگل های لیشمانیا در پشه خاکی های ناقل حائز اهمیت بوده و وجود آنها برای رشد و مهاجرت انگل به سر حشره ضروری می باشد (۹۶، ۹۷). در آلودگی تجربی *P. langeroni* و *P. papatasi* با انگل *L. major* نشان داده شده که تغذیه از قند سوکروز ۳۰٪ نقش اصلی را در مهاجرت انگل ها

به قسمت قدامی دستگاه گوارش دارد. احتمالاً کربوهیدراتها انتقال انگل را از طریق اثر بر لکترین افزایش می دهند. کربوهیدراتها از واکنش های آگلوتیناسیون انگل که با واسطه لکترین انجام می شود و از اتصال و تشکیل فرم روزت پروماستیگوتها یا پاراماستیگوتها، ممانعت می کنند. حضور مولکولهای ممانعت کننده آگلوتیناسیون یا اتصال (مانند کربوهیدراتها) در معده میانی، می تواند تعداد پروماستیگوتهای آزاد و شناور که قادر به کلنی شدن در خرطوم هستند، را افزایش دهد (۹). تغذیه از بعضی مواد گیاهی طبیعی، اثر زیان آوری بر روی انگل های لیثمانیا داشته و سبب از بین رفتن آنها می شود. در این رابطه بر طبق آخرین بررسی های انجام شده در مورد تغذیه *P.papatasi* آلوده به *L.major* از مواد گیاهی، مشخص شده است که پشه خاکی هایی که از مواد گیاهی تغذیه می نمایند، دارای ذرات ریزی در معده خود می باشند که با تکنیک های خاص رنگ آمیزی قابل شناسایی می باشد. این ذرات در ۳۴٪ ماده ها و ۱۳/۴٪ نرهای مورد آزمایش، بعد از تغذیه تجربی آنها در آزمایشگاه مشاهده شده است ولی در معده نمونه هایی که از عسلک تغذیه نموده اند و همچنین در پشه های تغذیه نکرده (شاهد) چنین ذراتی مشاهده نشده است (۹).

در مورد تاثیر این مواد بر روی انگل ها، نتایج این مطالعه نشان داده است که تغذیه از گیاه *Malva nicaeensis* و عسلک *Icerya purchase* به سود انگل های لیثمانیا بوده، در حالی که در تغذیه پشه خاکی از انواع دیگر گیاهان مورد آزمایش، مرگ و میر و تغییر شکل انگل به مقدار بیش از ۵۰٪ مشاهده شده است. این وضعیت همچنین در ۲۱ مورد از ۹۴ پشه خاکی آلوده در طبیعت نیز مشاهده گردیده است. ولی نکته جالب توجه اینکه، کلیه این ۲۱ مورد جزو ۳۸ نمونه ای بوده اند که از لحاظ رشد و تکثیر انگل لیثمانیا در مراحل پیشرفته بوده اند و به نظر می رسد که این گروه بیشتر آسیب پذیرتر می باشند. به طور کلی نتایج این مطالعه حاکی است که بعضی از رژیم های گیاهی *P.papatasi* در طبیعت به انگل های *L.major* در پشه خاکی آسیب رسانده و بدین وسیله قابلیت

انتقال لیثمانیوز را کاهش می دهد. تغذیه از گیاهان *Capparis spinosa*، *Ricinus communis* و *Solanum luteum* موجب اختلال در تکثیر و رشد انگل لیثمانیا می شود (۹۸).

تغییرات فصلی و سالانه فعالیت

مطالعه فعالیت فصلی پشه خاکی ها، از نظر تعیین دوره انتقال بیماری و در نتیجه اقدامات پیشگیری و انتخاب زمان مناسب جهت عملیات کنترل اهمیت بسزایی دارد. فصل فعالیت پشه خاکی ها بسته به عرض جغرافیایی و ارتفاع محل متفاوت بوده و بطور کلی تحت تأثیر عوامل محیطی می باشد که مهمترین آنها درجه حرارت و میزان بارندگی می باشد (۸۷، ۸۴). به عنوان مثال در آسیای مرکزی فعالیت پشه خاکی ها هنگامی شروع می شود که متوسط درجه حرارت روزانه به ۱۸-۲۰ درجه سانتی گراد برسد، و یا در کنیا مشخص شده که ارتباط نزدیکی بین بارانهای بهاره و افزایش جمعیت *P.martini* وجود دارد. پشه خاکی های مناطق گرم و مرطوب ممکن است در فصول خشک یا مرطوب و یا در سراسر سال فعالیت داشته باشند، ولی انواع منتشره در مناطق معتدله پاله-آرکتیک فقط در تابستان فعالیت کرده و با شروع اولین دوره سرما فعالیت آنها متوقف می گردد (۸۷، ۹۹).

در بعضی از مناطق وفور پشه خاکی ها در طول فصل فعالیت، دارای دو نقطه اوج می باشد که احتمالاً نشانگر تعداد نسل آنها می باشد، ولی بعضی از گونه های مناطق معتدله دارای یک نقطه اوج فعالیت بوده و در نتیجه سالیانه یک نسل دارند. در مناطق آب و هوایی مساعدتر، بعضی از گونه ها می توانند تا سه نسل در سال نیز داشته باشند (۸۷، ۸۴). به عنوان مثال بر اساس بررسی هایی که برای تعیین فصل فعالیت پشه خاکی ها در مشهد و لطف آباد صورت گرفته، مشخص شده است که پشه خاکی های این مناطق از اردیبهشت تا اوایل مهرماه فعالیت داشته و منحنی وفور آنها دارای دو نقطه اوج می باشد (۱۰۰). در مناطق پاله آرکتیک بعضی از گونه ها مانند *P.ansari* سالیانه دارای یک نسل و *P.papatasi* و *P.caucasicus* در سال دو نسل دارند (۱۰۱). پشه خاکی ها همچنین

دارای نوسانات جمعیتی سالیانه نیز می باشند که احتمالاً بستگی به درجه حرارت محیط دارد. به عنوان مثال گزارش گردیده که جمعیت *P.papatasi* در بعضی از کشورها تا اندازه زیادی، سال به سال تغییر می کند و یا در جنوب غربی برزیل جمعیت *Lu.intermedia* دارای تغییرات سالانه می باشد (۸۷).

شرایط لازم برای معرفی یک گونه پشه خاکی به عنوان ناقل احتمالی یا قطعی بیماری

- ۱- فرم متاسیکلیک انگل لیثمانیا بایستی از پشه خاکی های وحشی جدا شود و این انگل بایستی همان گونه انگل عامل بیماری در انسان باشد که از همان محل جدا شده است.
- ۲- پشه خاکی ناقل مشکوک بایستی انسان دوست (آنتروپوفیل) و در جایی که انسان آلوده شده است حضور داشته باشد.
- ۳- توزیع جغرافیایی ناقل مظنون بایستی در برگیرنده توزیع بیماری در انسان بوده و وفور آن برای حفظ انتقال انگل کافی باشد.
- ۴- باید ثابت شود که پشه خاکی های آلوده می توانند به طور طبیعی یا آزمایشگاهی آلودگی را از طریق تکمیل چرخه زندگی خارجی انگل در خود نگهداری نمایند.

۵- اگر سایر ملاک ها محقق شوند، انتقال آزمایشگاهی لیشمانیا به وسیله گزش، مستند قطعی ناقل بودن پشه خاکی برای انگل معین است (۹۷).

ناقلین لیشمانیوز در ایران

الف- لیشمانیوز جلدی

لیشمانیوز جلدی ایران (سالک جلدی) به دو فرم در کانون های این بیماری دیده می شود که شامل لیشمانیوز جلدی شهری (سالک خشک) و لیشمانیوز جلدی روستایی (سالک مرطوب) می باشند. در سیکل انتقال این دو فرم گونه هایی از پشه خاکی ها نقش دارند که شامل موارد زیر می باشند:

۱- *P. sergenti*: این گونه بر اساس شواهد اپیدمیولوژیک به عنوان ناقل قطعی بیماری سالک شهری شناخته شده و در نقاط فراوانی از کشور شامل استان های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، اصفهان، ایلام، بوشهر، تهران، زنجان، چهارمحال و بختیاری، خراسان رضوی، خوزستان، سمنان، البرز، سیستان و بلوچستان، فارس، قم، کرمان، کردستان، کرمانشاه، مرکزی، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران، هرمزگان، همدان و یزد پراکندگی دارد. از این گونه تاکنون سه morphotype در ایران گزارش شده است. مطالعات انجام شده در مورد آلودگی انگلی این گونه در ایران، آلوده بودن آن به انگل های *L. tropica* و *L. near gerbilli* را نشان داده است (۳۰، ۷۰، ۸۵، ۱۰۲-۱۰۶). (شکل ۱-۱۰).

۲- *P. papatasi*: این نوع از پشه خاکی ها به عنوان ناقل اصلی بیماری سالک روستایی شناخته شده و در کانون های انتشار این نوع از بیماری به فراوانی وجود دارد. از این گونه، انگل های *L. major* و *L. turanica* جدا شده است و از استان های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، اصفهان، ایلام، تهران، زنجان، چهارمحال و

بختیاری، خراسان رضوی، خوزستان، سمنان، سیستان و بلوچستان، فارس، قم، کرمان، کردستان، کرمانشاه، گلستان، مرکزی، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران، هرمزگان، همدان و یزد گزارش شده است (۱۱-۱۶، ۳۲-۳۷، ۴۰، ۴۱، ۶۴-۷۶، ۷۲، ۷۰، ۶۸-۱۰۹). (شکل ۱-۱۰).

۳- *P.salehi*: این گونه به عنوان ناقل بیماری سالک روستایی و آلوده به انگل *L.major* در برخی از کانون های بیماری سالک مرطوب گزارش شده است و در استان های سیستان و بلوچستان، خراسان شمالی، لرستان، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری و هرمزگان صید شده است (۱۰۵). آلودگی لپتومونایی این گونه برای اولین بار از استان سیستان و بلوچستان گزارش شده است و به عنوان *L.major* در استان های فارس و هرمزگان این آلودگی تأیید شده است (۷۳، ۷۵، ۸۵، ۱۱۰، ۱۱۱). (شکل ۱-۱۰).

۴- *P.ansari*: این گونه و گروه *P.caucasicus* نیز می توانند در انتقال بیماری لیشمانیوز جلدی در بین جوندگان موثر بوده و باعث حفظ چرخه انتقال بیماری خواهند بود (۱۶، ۴۲).

ب- لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)

این نوع بیماری در ایران فقط به یک فرم دیده می شود و انگل بوجود آورنده آن *L.infantum* است که بیشتر کودکان زیر پنج سال را مبتلا می کند و در صورت عدم درمان تا ۹۵٪ می تواند کشنده باشد. تاکنون بیش از پنج گونه از پشه خاکی های ایران دارای آلودگی لپتومونایی به انگل *L.infantum* گزارش شده اند که چهار گونه از آنها در زیر جنس *Larroussius* قرار دارند که به عنوان ناقلین لیشمانیوز احشایی ایران مطرح هستند (۲۷، ۳۸، ۱۱۲، ۱۱۳). گونه دیگری که با استفاده از روش های PCR آلودگی آن به انگل *L.infantum* تأیید شده است

گونه *P.alexandri* می باشد (۲۶). گونه هایی که در انتقال لیشرمانیوز احشایی ایران به عنوان ناقل معرفی شده و یا مظنون به انتقال این فرم از بیماری هستند شامل موارد زیر می باشند:

۱- *P.kandelakii* این گونه به عنوان ناقل بیماری کالاآزار در شمال غربی ایران معرفی شده است و از استان های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، اصفهان، ایلام، تهران، زنجان، تهران، چهارمحال و بختیاری، خراسان، خوزستان، سمنان، سیستان و بلوچستان، فارس، قم، کرمان، کردستان، کرمانشاه، گیلان، مرکزی، کهگیلویه و بویراحمد، لرستان، مازندران، هرمزگان، همدان و یزد گزارش شده است. آلودگی این گونه به انگل *L.infantum* در شمال شرقی کشور در استان خراسان و همچنین شمال غربی کشور گزارش شده است (۳۸، ۸۵). (شکل ۱-۱۱).

۲- *P.keshishiani* این گونه به عنوان ناقل بیماری لیشرمانیوز احشایی برای اولین بار از استان فارس گزارش گردید (۱۱۲) و در استان های آذربایجان غربی، اردبیل، بوشهر، تهران، چهارمحال و بختیاری، خوزستان، سیستان و بلوچستان، فارس، مرکزی، کردستان، کرمانشاه، هرمزگان و همدان گزارش شده است (۸۵، ۱۰۵). (شکل ۱-۱۱).

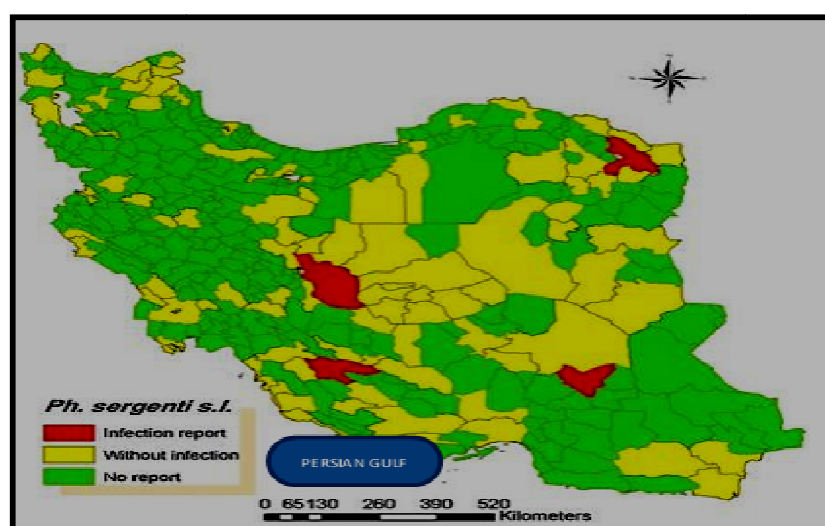
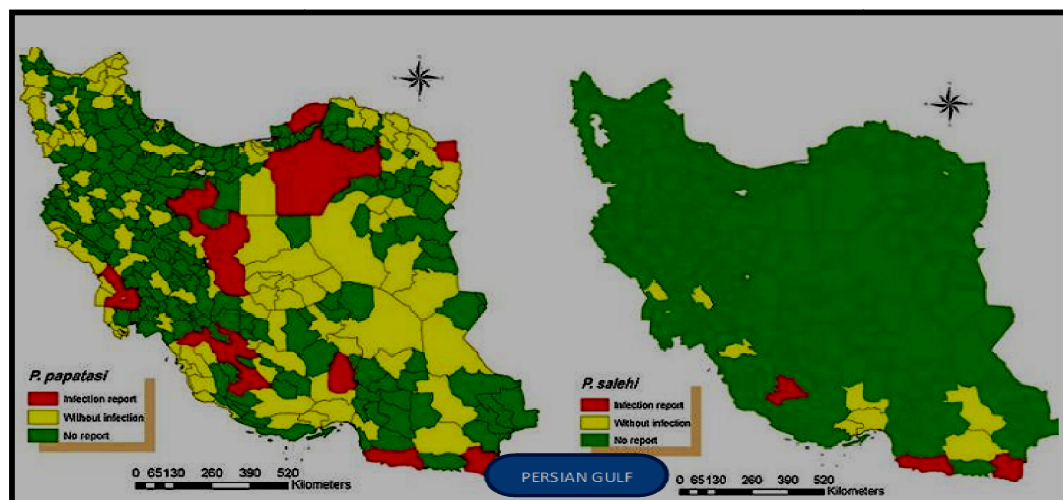
۳- *P.perfiliewi* این گونه به عنوان ناقل لیشرمانیوز احشایی در شمال غربی ایران محسوب می شود و از استان های آذربایجان غربی، اردبیل، ایلام، تهران، زنجان، کردستان و کرمانشاه گزارش شده است. مطالعات انجام شده در ایران بیانگر آلودگی این گونه به *L.infantum*، *L.donovani* و *L.tropica* می باشد (۳۸، ۸۵، ۱۱۳). (شکل ۱-۱۱).

۴- *P.alexandri*: این گونه به عنوان ناقل احتمالی بیماری لیشرمانیوز احشایی محسوب می شود (۲۶) و در استان های آذربایجان غربی، اردبیل، اصفهان، ایلام، بوشهر، تهران، چهارمحال و بختیاری، خراسان، خوزستان، سمنان،

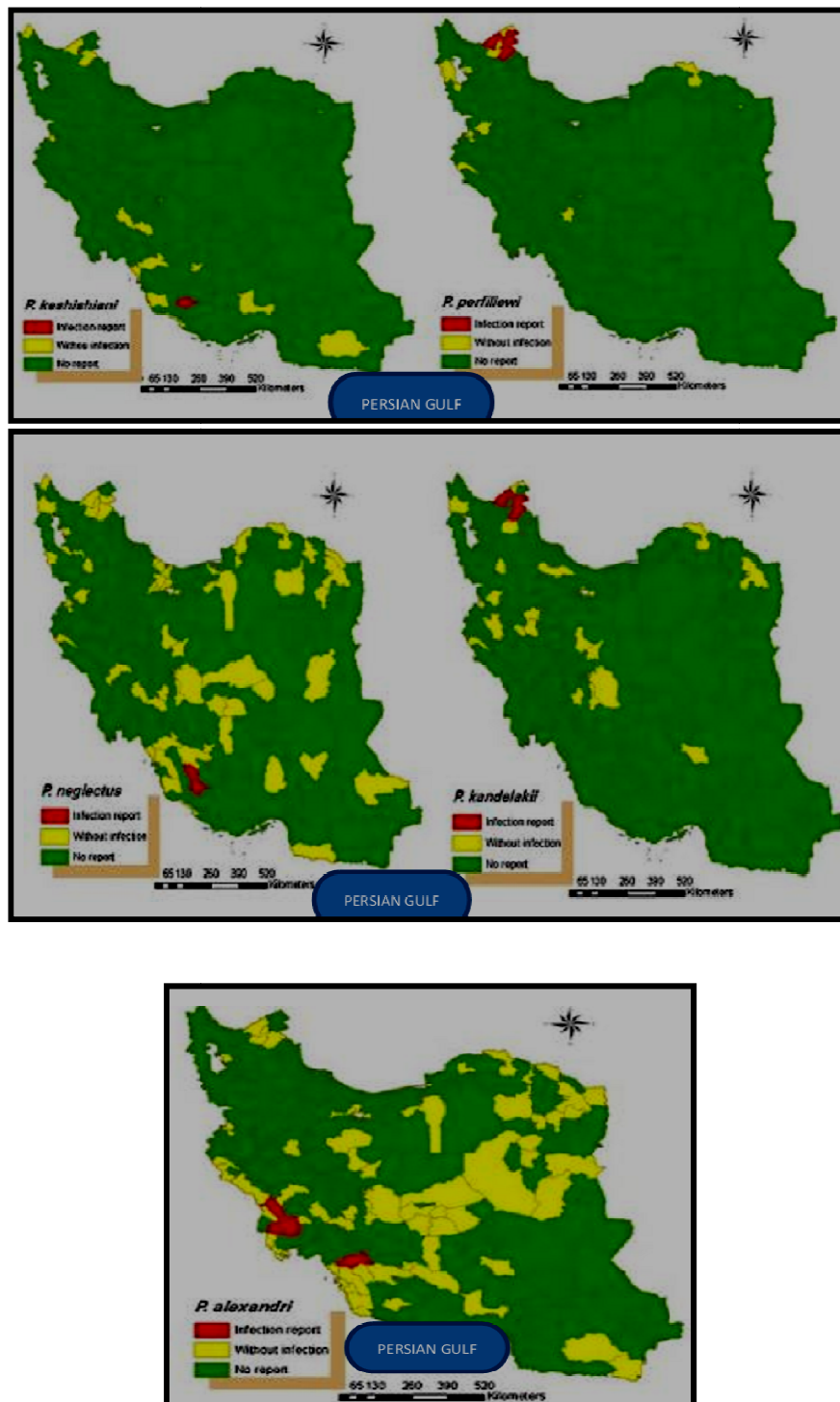
سیستان و بلوچستان، فارس، قم، کرمان، کردستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، لرستان، مازندران، هرمزگان، همدان و یزد وجود دارد (۱۰۵، ۸۵). (شکل ۱-۱۱).

۵- *P.neglectus* یا *P.major* s.l این گونه تقریباً در اکثر نقاط کشور پراکندگی دارد ولی آلودگی آن به انگل *L.infantum* فقط از استان فارس گزارش شده است (۱۰۵، ۲۷). (شکل ۱-۱۱).

علاوه بر این پنج گونه، آلودگی *P.tobbi* به انگل *L.infantum* نیز در شمال غربی ایران و استان البرز گزارش شده است (۱۰۴، ۳۹).



شکل ۱-۱۰: پراکندگی ناقلین لیشمانیوز جلدی شهری و روستایی در ایران تا سال ۱۳۹۱
(Karimi و همکاران، ۲۰۱۴)

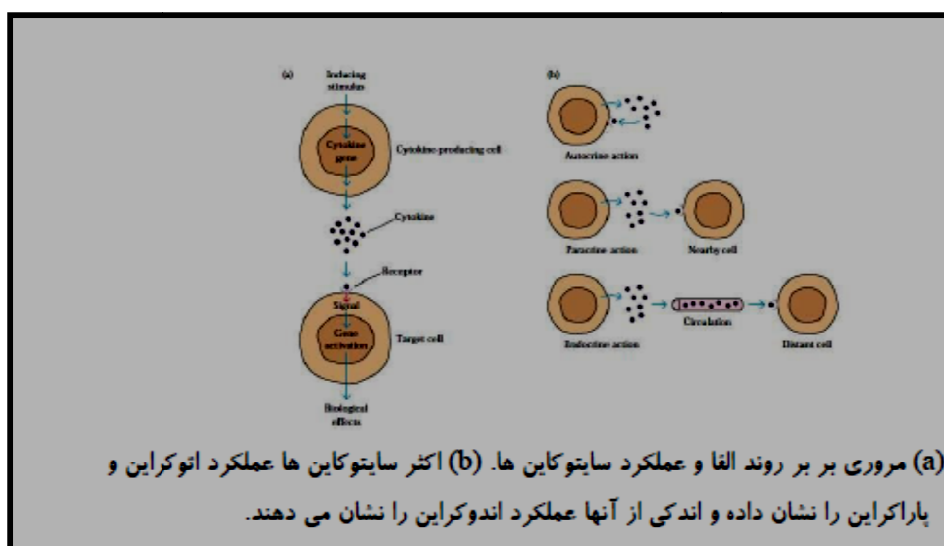


شکل ۱-۱۱: پراکندگی ناقلین بیماری لیشمانیوز احشایی در ایران تا سال ۱۳۹۱ (karimi و همکاران، ۲۰۱۴)

اینترلوکین ۴ (IL4)، پلی مورفیسم و نقش آن در سیستم ایمنی بیماران لیشمانیوز جلدی

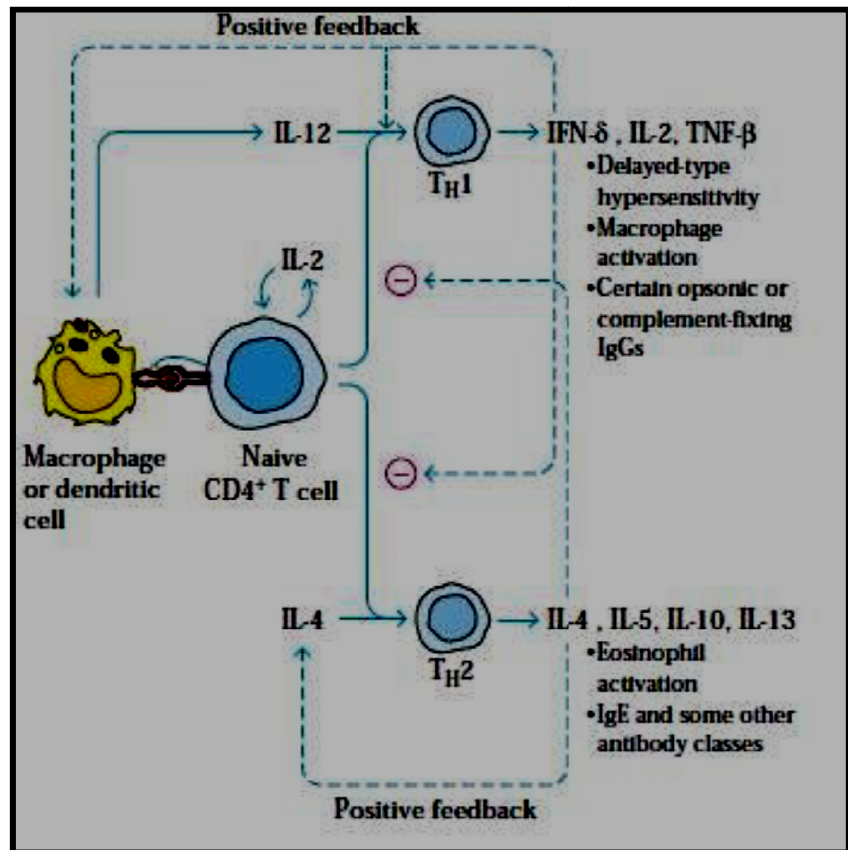
سیستم ایمنی بدن در فعالیت های زیادی از جمله فعالیت های التهابی، ازدیاد حساسیت، و از بین بردن عوامل بیماری زا (تک یاخته، کرم، باکتری و ویروس) شرکت دارد که فعالیت این سیستم در بسیاری از بیماری های عفونی و هم چنین دیگر بیماری ها نقش اساسی در حفظ سلامتی دارد. در شکل گیری یک پاسخ ایمنی مؤثر، سلولهای لنفاوی، سلولهای التهابی و سلول های خونساز دخالت دارند. میانکشی پیچیده بین این سلولها به گروهی از پروتئین ها وابسته بوده که سایتوکاین نام داشته و نقش ارتباط میان سلولها را بازی میکنند. سایتوکاین ها، پروتئینها یا گلیکوپروتئینهایی با وزن مولکولی کم بوده که توسط گلبولهای سفید یا دیگر سلولها در پاسخ به تعدادی از محرکها ترشح می شوند. این پروتئین ها در گسترش سلولهای مؤثر ایمنی شرکت داشته و تعدادی از آنها نیز اعمال خود را به صورت مستقیم انجام میدهند. اصطلاح سایتوکاین به آن دسته از سایتوکاینهایی که توسط لنفوسیت ها و منوسیت/ماکروفاژها اطلاق میشود که در گذشته با نامهای لنفو کاین و منو کاین خوانده میشدند اگر چه این دو اصطلاح هنوز مورد استفاده میباشند، ولی گمراه کننده هستند، زیرا ترشح برخی از لنفوکاینها و منوکاینها به لنفوسیتها و منوسیتها محدود نبوده و توسط طیف وسیعی از سلولها ترشح میشوند. به همین دلیل، بهترین اصطلاح پیشنهادی همان سایتوکاین میباشد (۱۱۴، ۱۱۵). اساس این فعالیت ها با تولید سایتوکین هایی نظیر IL-4، اینترفرون گاما، IL-2، IL-5 و تغییر در نسبت سلول های لنفوسیتی CD4+ و CD8+ همراه است. مقدار طبیعی نسبت CD4+/CD8+ با سن ارتباط داشته و از ۱/۵ تا ۲/۵ متغیر است. سایتوکاینها، پروتئینها یا گلیکوپروتئینهای محلولی هستند که به وسیله لکوسیتها و در بعضی از موارد توسط سایر انواع سلولها تولید شده و به عنوان رابطین شیمیایی بین سلولها عمل میکنند ولی خود به تنهایی مولکول عمل کننده (effector) نیستند، اغلب آنها ترشحی هستند اما بعضی می توانند بر روی غشاء سلول عرضه شده و یا درون مخزنی در ماتریکس خارج سلولی نگهداری شوند. سایتوکاینها به گیرنده های ویژه ای بر روی سطح سلول هدف متصل شده و از این طریق باعث انتقال پیام و فعال شدن مسیرهای پیامبر ثانویه می شوند برخی از سایتوکاینها را تحت عنوان اینترلوکین میشناسند و همانطور که از نام آن پیداست، توسط برخی گلبولهای سفید ترشح شده و روی گلبول های سفید دیگر اثر میگذارد. تاکنون، اینترلوکینها را از IL1 تا IL29 طبقه بندی کرده اند. دلایلی وجود دارند که اینترلوکینهای بیشتری کشف خواهند شد و در نتیجه، گروه اینترلوکین ها توسعه بیشتری خواهد یافت (شکل ۱-۱۲). این مولکولها نقش مهمی را در پاسخهای التهابی ایفا می کنند. سایتوکاینها بر سطح سلولهای هدف، به پذیرنده های اختصاصی

خود متصل شده و مسیرهای انتقال پیام را آغاز کرده که در نهایت بیان ژن‌ها را در این سلول‌ها تغییر می‌دهند (۱۱۶)
(۱۱۷،



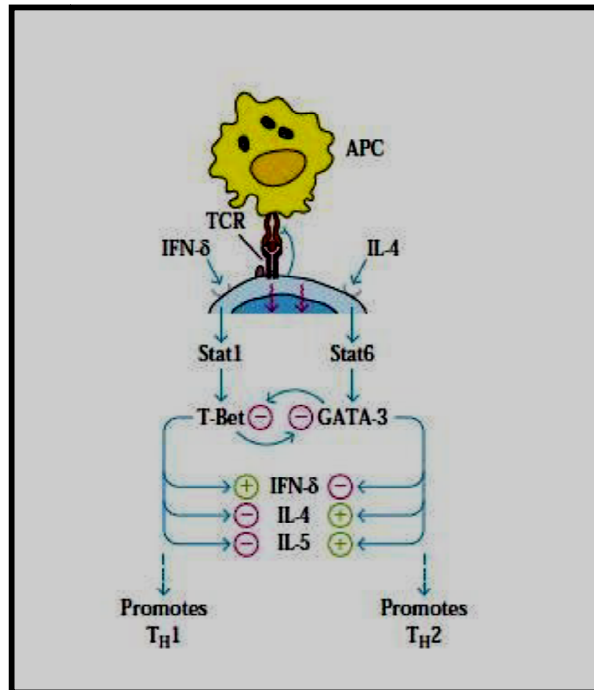
شکل ۱-۱۲: مروری بر روند القا و عملکرد سایتوکاین ها

هر چند که طیف وسیعی از سلول‌ها قادر به ترشح سایتوکاین‌ها می‌باشند ولی تولیدکننده‌های اصلی آنها، سلول‌های TH، سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها هستند. سایتوکاین‌های رها شده از این سلول‌ها، یک شبکه کامل از سلول‌های واکنش‌گر را فعال می‌کنند. در میان پاسخهای فیزیولوژیک متعدد، که به فعالیت سایتوکاین‌ها نیاز دارند میتوان به پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی، القای پاسخهای التهابی، تنظیم خونسازی، کنترل تکثیر و تمایز سلولی و بهبود زخم اشاره کرد. پاسخ ایمنی به یک پاتوژن خاص میبایست موجب القای یکسری از عملکردهایی گردد که باعث حذف عامل بیماریزا یا محصولات سمی آن از میزبان گردند. برای مثال، خنثی سازی یک سم محلول باکتریایی به آنتی بادیها نیاز دارد، در حالی که پاسخ به یک ویروس داخل سلولی یا سلول باکتریایی به ازدیاد حساسیت تأخیری یا سیتوتوکسیسته سلولی نیاز دارد. شواهد متعددی مبنی بر وجود تفاوت‌هایی در الگوی ترشح سایتوکاین توسط زیررده‌های سلول TH به عنوان شاخصهای برای نوع پاسخ ایمنی به یک پاتوژن خاص، وجود دارد، دو زیر جمعیت از سلولهای TH CD4H به نامهای TH1 و TH2 در شرایط IN VITRO توسط شکل‌گیری زیر رده های TH1 و TH2 با محیط سایتوکاینی مشخص می‌گردد (شکل ۱-۱۳)



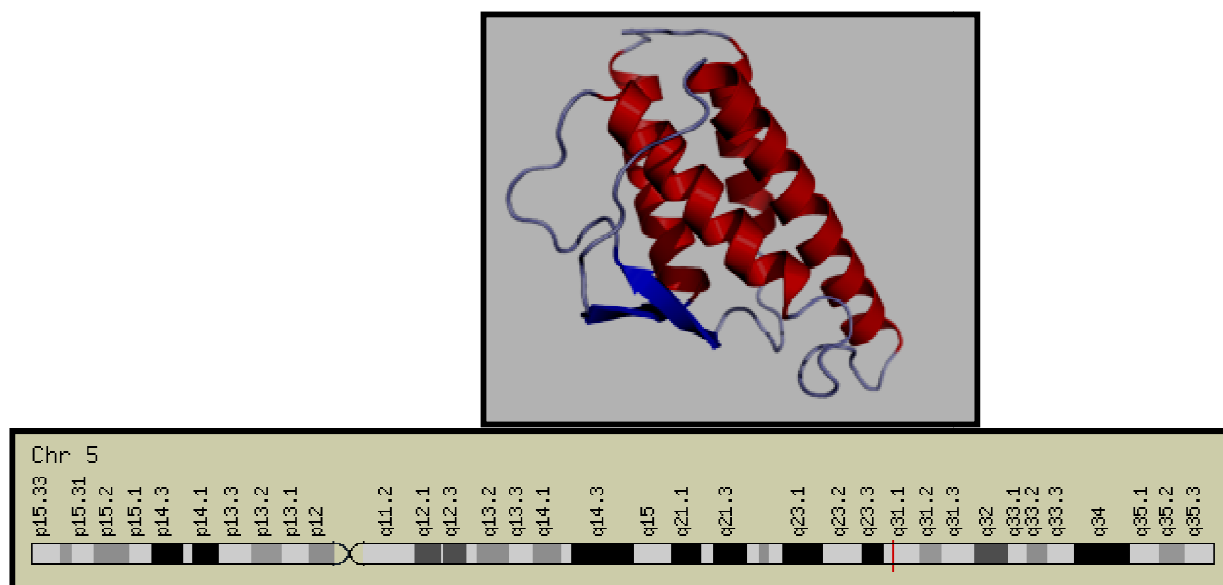
شکل ۱-۳: شکل گیری زیر رده های TH1 و TH2 با محیط سایتوکایینی

دو فاکتور نسخه برداری T-BET موجب پیشبرد سلول ها به سمت TH1 و مهار تمایز آنها در مسیر TH2 می گردد. بیان GATA-3 اثر متضادی داشته و موجب تمایز سلول های T دست نخورده به TH2 و مهار تمایز به TH1 می شود. تنظیم متقاطع در سطح داخل سلولی، پیام های ناشی از TCR و پذیرنده های سایتوکاین تعیین میکنند که سلول، فاکتور نسخه برداری افزایش دهنده TH1 (T-BET) یا فاکتور های نسخه برداری افزایش دهنده TH2 (GATA) را بوجود آورد. سایتوکاین های اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما تعیین کننده بیان T-BET یا GATA می باشند. در حضور IFN- μ ، بیان T-BET در سلول های T افزایش و بیان GATA کاهش می یابد. (شکل ۱-۱۴). (۱۱۸، ۱۱۹).



شکل ۱-۱۴ تولید و تنظیم متقاطع زیر مجموعه های T Helper به واسطه سایتو کاین ها

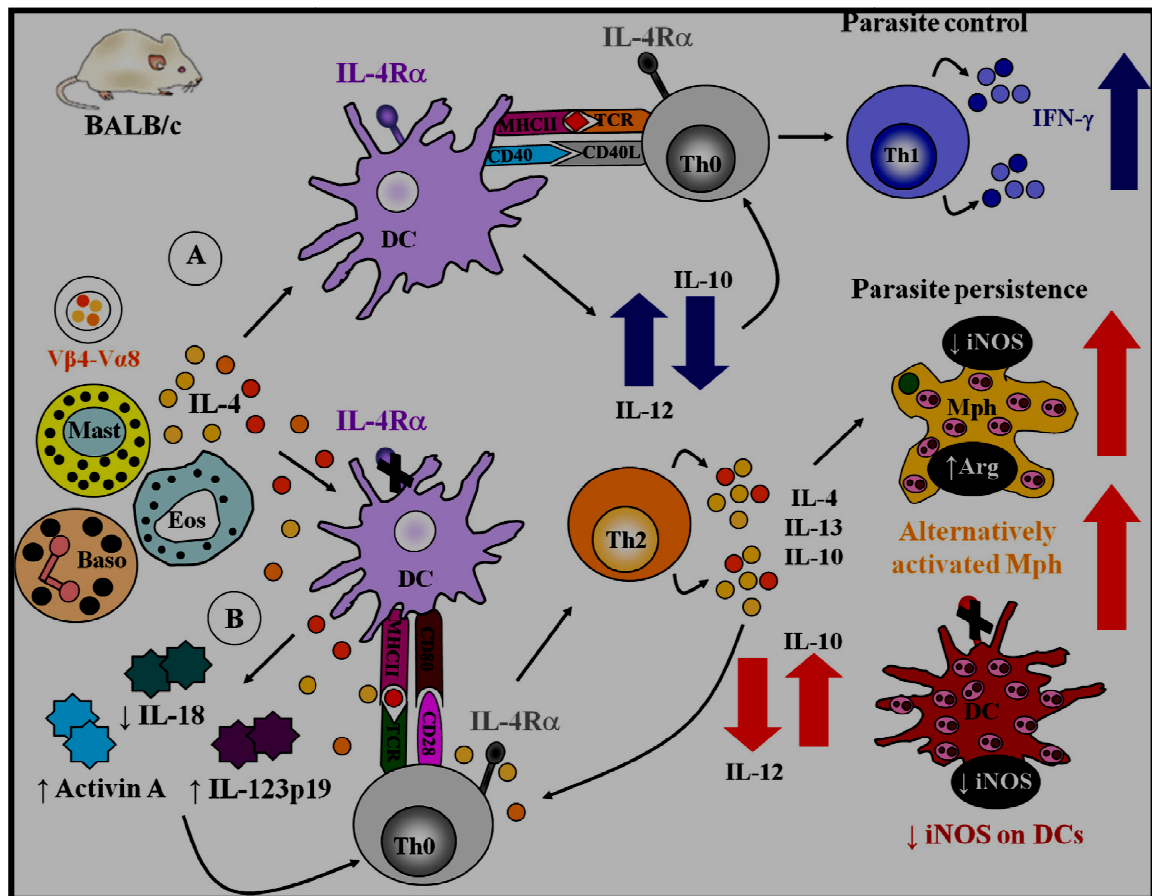
اینترلوکین ۴ یک ملکول پروتئین با ساختار فشرده و کروی شکل بوده و در سال ۱۹۸۲ کشف شد و چهار سال بعد توالی و سکانس ژنی آن جدا گردید این ملکول بوسیله سه باند دی سولفیدی در حالت پایدار قرار می گیرد و دارای ساختار آلفا هلیکس (alpha-helix) و صفحات بتا (beta-sheet) آنتی پار ژنوتیپ (anti-parallel) است (شکل ۱-۱۵) و ژن آن بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۵ قرار دارد و دارای ۸۹۹۶ باز می باشد ۱۱۹، (۱۲۰، ۱۲۱). (شکل ۱-۱۵)



شکل ۱-۱۵: ساختار کریستالی و ژنی اینترلوکین ۴

در سالهای اخیر به دنبال تقسیم بندی سولهای T کمک کننده (T helper) به دو جمعیت متفاوت Th1 و Th2 توسط Mosmann انقلابی در شناخت ایمنوپاتولوژی و تعیین وضعیت بالینی بیماری های مختلف از جمله بیماری های عفونی به وجود آمد. سلول های Th1 با ترشح سیتوکاین هایی نظیر اینترلوکین-۲ (IL-2) و اینترفرون-گاما باعث افزایش فعالیت های ایمنی سلولی، و سلول های Th2 با ترشح سیتوکاینهایی نظیر IL-4، IL-5 و IL-10 کمک لازم را برای تولید پاسخ های ایمنی هومورال و فعال شدن سلول های B فراهم می نمایند (۱۲۲). Th1 و Th2 از یک پیش ساز اولیه Th0 مشتق می شوند که می تواند انواع سیتوکاین های Th1 و Th2 را ترشح کند. مطالعات اخیر بر روی موش های آلوده به انگل لیشمانیا بیانگر دو نقش متضاد IL4 بوده است و اینکه سطح و میزان ترشح و تولید IL4 نقش مهم و حیاتی در ایفای دو نقش متضاد IL4 دارد بطوریکه اگر مقدار ترشح IL4 در مراحل اولیه ورود انگل لیشمانیا (و یا هر انگل داخل سلولی) اتفاق بیافتد چون در این مرحله DC ها در حال فعال شدن هستند، در نتیجه فعال شدن آنها TH1 تولید میشود و لذا تولید سایتو کاین های IL12 و γ -INF افزایش می یابد و موش های آلوده به انگل قادر به مهار و کنترل بیماری میشوند همچنین بررسی ها نشان داد حتی با وجود تولید اولیه IL4، در صورت فقدان و یا نقص در گیرنده IL4 α سلول های DC نتیجه به سمت تولید TH2 پیش

خواهد رفت و بیماری در موش آلوده گسترش می یابد. این نتایج بوسیله مطالعات دیگری هم تایید شد. وقتی به موش IL4Adjuant تزریق شد اثرات واکسن بدست آمده از IL12-Mediated Vaccine را تقویت شد و حتی مشخص شد که اگر این واکسن به تنهایی استفاده شود غیر موثر است در حالیکه اگر با ALUM که یک عامل تحریک کننده IL4 است همراه گردد موثر و کارا خواهد بود (شکل ۱-۱۲). (۱۲۳، ۱۲۴). سلول های ارائه دهنده آنتی ژن (APC) مثل DC ها میتوانند باعث تحریک رده خاصی از T سل ها شوند. خود APC ها هم تحت تاثیر سیگنال های حاصل از سیستم ایمنی ذاتی و غیر اختصاصی هستند. آن دسته از APC ها که قادر به دریافت و ایجاد سیگنال برای تمایز سلول های TH0 به TH1 باشند، باعث مقاومت در برابر انگل میشوند و به آنها DC1 میگویند. APC ها همچنین بوسیله اثرات IL4 بطور انتخابی و تاثیر گذار توسعه می یابند یعنی اینکه اگر در مراحل اولیه رویارویی سلول با انگل L-Major که مرحله اول فعال شدن دندریتیک سل هاست، IL4 ترشح مناسبی داشته باشد و نهایتا منجر به افزایش th1 میگردد و این مساله باعث میشود که چنین DC هایی تعدادشان افزایش یابد و لذا یک فید بک مثبت در جهت بهبود و کنترل بیماری است و از طرف دیگر IL4 میتواند واکنش حساسیت تاخیری (DTHR) را هم افزایش دهد با بررسی ایمونولوژی عفونت لیشمانیا در کل چنین بنظر میرسد که برخلاف تئوری های قبلی که یک رابطه تعریف شده بین TH1 و TH2 را عنوان میکرد این مسیرها یک سری مسیرهای ارتباطی متقابل و تعاملی پیچیده هستند (۱۲۳).



شکل ۱-۶: پاسخ سیستم ایمنی در حضور و یا نبود اینترلوکین ۴

گرچه همه فاکتورهای موثر در سوق دادن پاسخ های سیتوکایینی به سمت Th1 و Th2 هنوز کاملاً شناسایی نشده و مکانیسم دقیق آن روشن نیست، اما مطالعات انجام شده نشان می دهد که عواملی مانند طبیعت آنتی ژن، رده سلولی عرضه کننده آنتی ژن، خود سیتوکاین ها و حضور انواع مختلف مولکول های کمکی به صورت محلول یا چسبیده به غشاء در نتیجه نهایی پاسخ موثر می باشند. مدل های موشی لیشمانیوز پوستی واضح ترین و شناخته شده ترین مثال برای الگوهای سیتوکایینی Th1 و Th2 بوده و امکان آنالیز اعمال زیر جمعیت های مختلف سلول های T را فراهم آورده اند. عمده دانش بشر در مورد Th1 و Th2 از مطالعه بر روی این مدل ها به دست آمده است. سایتوکاینها مولکولهای موثری در ایمنی سلولی هستند و در این میان ژن اینترلوکین ۴، نقش تعیین کننده ای در ایمنی زایی و میزان وفور انگل در بدن میزبان دارد. وزن ملکولی اینترلوکین ۴ 20KD می باشد که یک فاکتور رشد و تمایز سلوهای B است و در سنتز آنتی بادی به وسیله این سلولها موثر است. در ضمن اینترلوکین ۴ به عنوان فاکتور رشد

autochrine برای رده های سلوهای CD4+T می باشد و نیز یک فاکتور فعال کننده ماکروفاژها می باشد. تعدادی از ژن های انسانی و حیوانی شامل TNF آلفا، TNF بتا، اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۱۰ و اینترفرون گاما ممکن است در شدت و بروز بیماری در لیشمانیوز جلدی نوع روستایی شرکت داشته باشند (۱۲۵، ۱۲۶، ۱۲۷). پاتولوژی لیشمانیازیس متغیر بوده و معمولاً بر اساس فاکتورهای محیطی، ناقل انگل، سویه انگل لیشمانیا و ژنتیک میزبان مشخص می گردد، بنابراین مدل های موش آزمایشگاهی به طور گسترده برای تعیین تاثیر ژنتیک میزبان بر بروز و شدت بیماری لیشمانیوز به کار رفته اند (۱۲۵). لیشمانیا ماژور که در انسان باعث زخم پوستی می شود، در مدل های موشی بسته به زمینه ژنتیکی آنها تظاهرات مختلفی را نشان می دهد. موش های مقاوم با ایجاد یک ایمنی موثر بر علیه لیشمانیا عامل عفونت را از بین می برند و بیماری روند مثبتی را طی می کند، در حالی که در موش های حساس Balb/c به دلیل فقدان یک ایمنی موثر عفونت انتشار یافته و بیماری جلدی تبدیل به نوع احشایی پیش رونده می شود. اطلاعات موجود نشان می دهد که ایجاد مقاومت یا حساسیت به عفونت *L. major* عمدتاً به تولید سیتوکاین های Th1 و Th2 بستگی دارد. اینترفرون گاما با فعال سازی ماکروفاژ و در نتیجه از بین بردن انگل های داخل سلولی باعث کنترل بیماری می شود، در حالی که IL-4 باعث حساسیت در مقابل بیماری می شود (۱۳۱، ۱۳۵). اینترلوکین ۴ (IL-4) سیتوکاینی است که باعث تمایز سلولهای Th0 به Th2 می شود. در این صورت، و سلولهای Th2 باعث تولید اینترلوکین ۴ می شوند (۱۲۸). اینترلوکین ۴ باعث کاهش تولید سلولهای Th1، ماکروفاژها، اینترفرون گاما و اینترلوکین ۱۲ می گردند (۱۲۹). تزریق اینترلوکین ۲۲ به موش های آزمایشگاهی که دارای زخم های ناشی از وجود انگل لیشمانیا میجر بودند، باعث افزایش تولید اینترفرون گاما و کاهش تولید اینترلوکین ۴ گردید. دانشمندان اتفاق نظر دارند که تولید به هنگام اینترفرون گاما و اینترلوکین ۱۲ باعث تولید سلولهای Th1 و اینترلوکین ۴ باعث تولید سلولهای Th2 می گردند که در این صورت باعث حساسیت به *L. major* خواهد گردید (۱۳۰-۱۳۴).

درمان رایج لیشمانیوز جلدی در انسان، ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موآن شامل گلوکانتیم و پنتوستام می باشد، اما این درمان برای لیشمانیوز احشایی کافی نبوده و نمی تواند در بهبود بیماری موثر باشد. در موش های Balb/c که عفونت *L. major* را به صورت احشایی و کشنده نشان می دهند و بدین ترتیب می توانند مدلی برای لیشمانیوز احشایی در انسان باشند، ترکیبات آنتی موآن با اثر مستقیم بر انگل تعداد انگل را کاهش داده و پیشرفت زخم را به

تاخیر می اندازند ولی پس از قطع درمان بلافاصله بیماری به همان صورت اولیه و نهایتاً شکل کشنده بروز می کند. بررسی های اخیر با استفاده از مدل های موشی نشان می دهد که درمان موفق در لیشمانیوز نه تنها نیازمند کاهش تعداد و حذف انگل می باشد بلکه شدیداً به توسعه یک پاسخ موثر ایمنی سلولی نیازمند است. یعنی در لیشمانیوز باید از ایمونوتراپی در کنار شیمی درمانی استفاده کرد. در لیشمانیوز پوستی نوع شهری و روستایی یافته ها حاکی از این است که اگر دوران عفونت بطور طبیعی سپری شود، پس از بهبودی، مقاومت طولانی مدت در برابر عفونت مجدد ایجاد می شود. همچنین گزارش هایی در مورد عدم مصونیت پس از استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی و یا ابتلا به ایدز موجود است. لازم به ذکر است که IL-10 اثر مهار بر روی ماکروفاژها دارد و عمل طبیعی آن ها را مهار کرده و منجر به تشدید عفونت و بیماری می شود (۱۳۶). مولکول های متعدد موثری در بیولوژی انگل لیشمانیا در راستای تولید آنتی بادی های اختصاصی میزبان و پاسخ ایمنی سلولی شناسایی شده است. پروتئین های حاصل از کشت و فیلتر کردن محیط کشت پروماستیگوت های *L. major* موجب ایمنی قوی در موش Balb/c آلوده به *L. major* و سگ و انسان شده اند (۱۳۷). یکی از پروتئین هایی که در لیشمانیا به عنوان دفعی-ترشچی معرفی شده، آنتی ژن ۲-سطحی پروماستیگوت (Promastigote surface Antigen-2=PSA-2) است. این پروتئین عامل پاسخ ایمنی قوی Th1 در انسان و باعث محافظت در مقابل چالش بیماری زا در عفونت تجربی موش می باشد (۱۳۸). در بدن میزبان و در محیط کشت، انگل ها مولکول های متنوعی را ترشح و دفع می کنند. بعضی از این مولکول ها در تحریک و میانکنش (interaction) بین انگل و میزبان نقش مهمی دارند. مطالعات انجام شده بر روی مواد دفعی-ترشچی انگل های *L. infantum* و *L. mexicana* نشان داده است که این مواد دفعی-ترشچی به طور موثری سیستم ایمنی را تحریک می کنند. به همین دلیل می توان با استفاده از مواد دفعی-ترشچی مناسب و در نتیجه با تقویت سیستم ایمنی و ایجاد محافظت به کنترل بیماری نائل آمد.

پلی مورفیسم های ژنتیکی می توانند در قسمت پروموتور و یا ناحیه رمز کننده ژن سیتوکاین ها وجود داشته باشند و در نتیجه باعث تغییر در بیان ژن و یا تغییر عملکرد سیتوکاین به واسطه تغییر ساختار شوند. نقش های گوناگون سیتوکاین ها و انواع پلی مورفیسم های مربوطه در ناهنجاری های مختلف نشان داده شده است. (۱۳۹)

عوامل مختلفی در میزان تولید سایتوکاین ها توسط سیستم ایمنی اثر دارند. از جمله این عوامل پلی مورفیسم های موجود در ژن سایتوکاین ها در افراد مختلف می باشد. جابجایی نوکلئوتید ها و ایجاد برخی پلی مورفیسم ها در ژن سایتوکاین ها اثر مهمی در تولید و ترشح سایتوکاین ها دارد. برای مثال نشان داده شده است که جابجایی نوکلئوتید C به T در موقعیت -۵۹۰ ژن IL4 موجب کاهش بیان این سایتوکاین خواهد شد به گونه ای که اگر فرد TT باشد افزایش بیان، CT کاهش بیان و CC کمترین بیان را خواهد داشت (۱۱۷).

اهمیت پلی مورفیسم های اینترلوکین ۴ در حساسیت یا مقاومت به انگل لیشمانیا به اثبات رسیده است (۱۲۶). به همین علت، حساسیت یا مقاومت به بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی ممکن است در هاپلوتایپ های مختلف و یا زیرگونه های مختلف یکسان نباشد. ارتباط پلی مورفیسم های مختلف اینترلوکین ۴ به حساسیت و یا مقاومت به بیماری لیشمانیوز نوع احشایی نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴۰). مطالعات صورت گرفته بر روی افراد حساس و مقاوم به بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی نشان داده است که تفاوت های معناداری در بروز این بیماری در صورت جا به جایی نوکلئوتیدها در پلی مورفیسم قسمت پروموتور ژن اینترلوکین ۴ در انسان وجود دارد (۱۲۶). مطالعات صورت گرفته ارتباط پلی مورفیسم های موجود در ژن اینترلوکین ۴ با بیماری دیابت نوع ۲ را نیز به اثبات رسانیده است (۱۴۱). از طرف دیگر بنابر مشاهدات انجام شده، نوع بروز علائم بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در رومبومیس اوپیموس های مناطق مختلف متفاوت می باشد، چنانچه در برخی نواحی، Jonde دارای زخم های حاد است ولی در برخی دیگر هیچگونه علامت ظاهری دال بر وجود بیماری در Jonde مشاهده نمی شود (۱۴).

فصل دوم

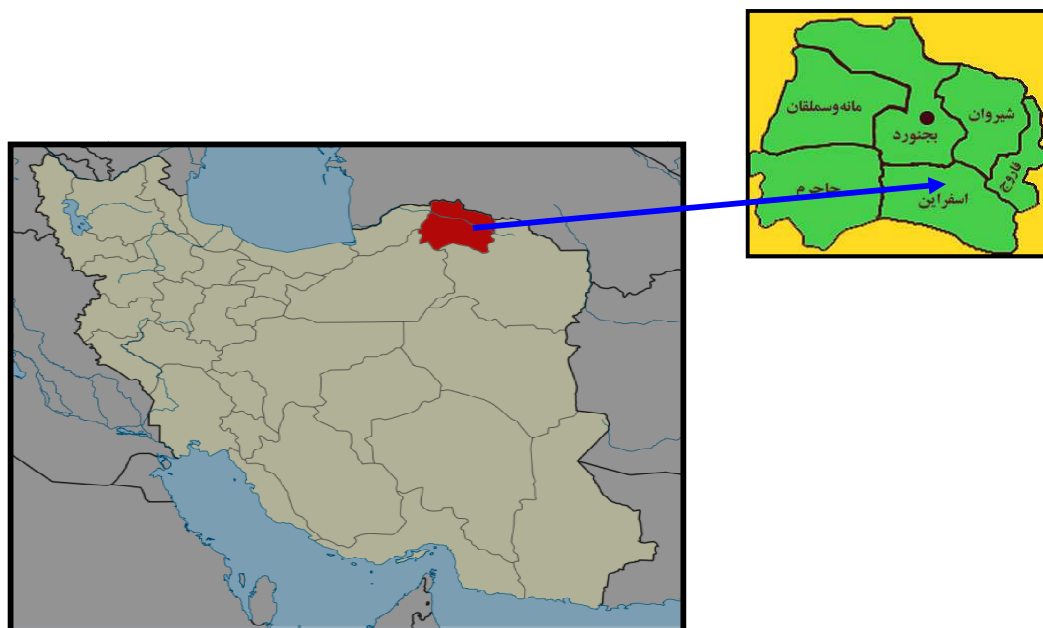
مواد و روشهای مطالعه

۲-۱- منطقه مورد بررسی

۲-۱-۱: استان خراسان شمالی

استان خراسان شمالی به مرکزیت شهر بجنورد یکی از استان‌های کشور ایران است. این استان با مصوبه دولت در سال ۱۳۸۳ و پس از تقسیم استان خراسان به سه استان، ایجاد شد.

استان خراسان شمالی با مساحتی حدود ۲۸۱۷۹ کیلومتر مربع از ۸ شهرستان بجنورد (مرکز استان)، شیروان، اسفراین، مانه و سملقان، راز و جرگلان، جاجرم، فاروج و گرمه تشکیل شده است. این استان از نظر موقعیت جغرافیایی، از شمال با کشور ترکمنستان، از شرق و جنوب با استان خراسان رضوی، از جنوب غربی با استان سمنان و از غرب با استان گلستان هم‌مرز است. خراسان شمالی از نظر ناهمواری‌ها به دو قسمت: الف) نواحی کوهستانی ب) پست و هموار تقسیم می‌شود. مرتفع‌ترین نقطه آن قله شاه جهان در رشته کوه‌های آلاداغ ۳۰۵۱ متر و پست‌ترین نقطه آن در روستای تازه یاب در قسمت خروجی رودخانه اترک با ارتفاع ۴۰۰۰ متر از سطح دریا قرار دارد. ارتفاع متوسط استان ۱۳۲۶ متر از سطح دریا می‌باشد. اقوام ساکن در استان خراسان شمالی شامل فارسی‌زبانان (بومی تات و غیره)، کردهای کرمانج، ترکها، ترکمنها می‌باشند. زبان‌های رایج نیز فارسی، کردی کرمانجی و ترکی خراسانی می‌باشد. به طور کل کردهای کرمانج ۳۷ درصد ترکیب جمعیت استان را تشکیل می‌دهند. پارسی‌ها ۲۹ درصد، ترک‌ها ۲۷ درصد و ترکمن‌ها ۵ درصد و اقوام عرب و بلوچ و لر نیز در این استان سکونت دارند.



شکل ۱-۲: موقعیت شهرستان اسفراین در استان خراسان شمالی

استان خراسان شمالی دارای آب و هوای متنوعی است ولی آب و هوای غالب در این منطقه، سرد کوهستانی است که در ارتفاعات آلاداغ و بینالود کاملاً حس می شود. تنوع آب و هوایی استان خراسان شمالی سبب به وجود آمدن اکوسیستم ها و چشم اندازهای متفاوتی شده و بر جاذبه های طبیعی گردشگری منطقه افزوده است. شهرستان های بجنورد و شیروان کاملاً در قلمرو آب و هوای سرد کوهستانی قرار گرفته اند. به طور کلی آب و هوای شهرستان اسفراین معتدل متمایل به سرد و خشک بوده، آب و هوای شهرستان جاجرم در قسمت های شمالی معتدل کوهستانی و دشت های جنوبی آن نیمه بیابانی از زمستان ملایم و تابستان گرم و خشک برخوردار بوده و بجنورد از آب و هوای نیمه معتدل با زمستان های سرد و تابستان های گرم برخوردار است.

منطقه بجنورد عموماً متأثر از دو توده هوایی سرد سبیری از سمت شمال و گرم مدیترانه ای خزری از سمت غرب می باشد بر اثر برخورد این دو توده هوایی با هم به ویژه در فصل زمستان پدیده بارش بصورت برف در مناطق مرتفع و تا حدودی به همراه باران در مناطق پست و دشت های منطقه صورت می گیرد. علی رغم سردی و خشکی توده هوایی سرد سبیری، توده هوایی خزری گرم و مرطوب می باشد به همین دلیل از سمت مشرق به سمت غرب بر میزان

رطوبت و اعتدال هوا افزوده می گردد.

اقلیم مدیترانه خراسان شمالی که تفاوت چشمگیری با سرزمینهای مجاور خویش از نظر برخورداری از مواهب طبیعی دارد، در حقیقت دروازه شمالی خراسان قدیمی محسوب می شود. خراسان شمالی از نظر طبیعی محصور بین دو رشته کوه کپه داغ در شمال و دنباله البرز یعنی آلاداغ، شاه جهان در جنوب و مجموعاً سرزمینی کوهستانی با دشتهای حاصلخیز در میان کوهها می باشد که شرایط بسیار مساعدی برای کشاورزی و دامپروری دارد. سردترین ماههای سال مربوط به ماههای دی و بهمن و گرمترین آن نیز طی ماههای تیر و مرداد است. متوسط دمای سالانه در سطح استان بین حداکثر ۱۷٫۹ درجه سانتیگراد در ایستگاه مراوه تپه در نواحی شمال غرب استان (واقع در استان گلستان) و حداقل ۹٫۷ درجه سانتیگراد در ایستگاه اسدلی در میانه جنوبی استان متغیر می باشد.

بر اساس مطالعات انجام شده در حال حاضر مقدار آبی که از طریق رودخانه ها، قنات ها، چشمه ها، چاه های عمیق و نیمه عمیق بدست می آید، حدود ۱٫۷ میلیارد متر مکعب می باشد ولی تنها ۵۰ درصد آن در امور کشاورزی و موارد دیگر مورد استفاده قرار می گیرد و بقیه به علت تبخیر و هرز رفتن از بین می رود. الف) آبهای زیرزمینی: شامل چاه های عمیق و نیمه عمیق، چشمه ها و قنات ها است که مجموع آب آنها حدود ۰٫۵۳ میلیارد متر مکعب تخمین زده میشود.

از چشمه های پر آب موجود در استان چشمه شوقان، چشمه گریوانو دشت چپانلو را می توان نام برد.

ب) آب های سطحی (رودها): رودخانه های جاری در سطح استان خراسان شمالی دارای میزان آبدهی متفاوت و متغیر در طول سال می باشند. که از منابع آب مهم استان می باشد.

۱) رودخانه اترک که مهم ترین رودخانه استان است و سایر رودخانه ها به عنوان تغذیه کننده آن می باشند

شهرستان اسفراین از شهرستانهای استان خراسان شمالی می باشد. مرکز آن شهر اسفراین است. و صفی آباد دیگر شهر آن است. این شهرستان در سال ۱۳۸۵، تعداد ۱۴۴، ۱۲۳ نفر جمعیت داشته است. اسفراین بین ۵۶ درجه و ۵۷ دقیقه تا ۵۸ درجه و ۷ دقیقه طول شرقی و ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۱۷ دقیقه عرض شمالی واقع شده است. این شهرستان از جنوب و جنوب غربی با شهرستان سبزوار، از شرق با قوچان و سبزوار و از غرب با بجنورد و شیروان همسایه است. ارتفاع شهرستان اسفراین از سطح دریا در بلندترین نقاط قله شاه جهان ۳۰۳۲ متر و در پست ترین نقطه حدود هزار متر می باشد. اسفراین در حاشیه جنوبی کوههای آلاداغ که خود در امتداد شرقی رشته کوه البرز قرار دارد و در قسمت جنوبی به ارتفاعات جغتای می پیوندد. مرکز شهرستان اسفراین شهر اسفراین و ارتفاع آن از سطح دریا ۱۲۶۰ متر است. قله شاه جهان در آلاداغ بلندتر از قله های دیگر کوههای شانو، دلقره، برمهان، پاتو، نادری، خیبران، ارسن، کول، گاوتیغ و قره داش است. ادامه کوههای آلاداغ در قسمت غربی شهرستان اسفراین با نام سالوک معروف است. رشته کوه دیگری که به موازات رودخانه جوین قرار دارد در جهت جنوب شرقی - شمال غربی، بین شهرستان های اسفراین و سبزوار امتداد پیدا کرده است. ارتفاع این رشته کوه از سطح دریا ۱۳۵۳ متر است و مهم ترین آنها کوه تپه سیاه و هرده گچی می باشد. با داشتن مجموعه صنعتی اسفراین و کارخانه لوله گستر اسفراین از شهرهای مهم صنعتی شرق ایران می باشد. شهرستان اسفراین یکی از شهرهای منطقه سربداران محسوب می گردد. پوشش گیاهی اسفراین در شهرستان اسفراین دو نوع پوشش گیاهی طبیعی قابل تشخیص استالف - جنگلها و مراتع: براساس آمار اداره کشاورزی اسفراین سطح جنگلها و مراتع این شهرستان حدود ۷۵۰۰۰/۴۵۰ هکتار می باشد که نسبت به کل اراضی زراعی تحت آیش و کشتهای مختلف و باغات که حدود ۷۵۰۰۰ هکتار است رقم قابل ملاحظه ای را تشکیل می دهد. در این جنگلها که در ارتفاعات شمالی و شمالی شرقی قرار

دارند، درختان و درخچه‌هایی مانند پسته، انار، سماق، زبان گنجشک، انجیر، زالزالک، ارغوان، ذغال‌اخته، گلابی وحشی، سنجد وحشی (در دره‌ها) و غیره را می‌توان نام برد. در ارتفاعات ساری‌گل، سالوک، شاه‌جهان جنگلهای پراکنده‌ای از درخت ارس نیز وجود دارد که در حقیقت نمی‌توان به آنها جنگل اطلاق کرد. این درختان توسط اداره محیط زیست شهرستان اسفراین حفاظت می‌شود. قسمتی از مراتع شهرستان اسفراین مراتع مشجر هستند. یعنی مراتع و جنگلهای تنک در کنار هم قرار دارند. ۶۰ درصد مراتع حوضه استحقاقی اداره جنگلبانی اسفراین که بیشتر در ارتفاعات مشرف به شهرستان بجنورد و شیروان هستند مراتع ییلاقی می‌باشند که به سه دسته تقسیم می‌شوند.

۱- مراتع درجه ۱، ۱۰ درصد

۲- مراتع درجه ۲، ۳۰ درصد

۳- مراتع درجه ۳، ۶۰ درصد

۴۰ درصد بقیه مراتع که در جنوب و جنوب غربی شهرستان پراکنده‌اند مراتع قشلاقی هستند. ۸۰ تا ۸۵ درصد مراتع قشلاقی درجه ۳ و ۱۵ درصد بقیه جز مراتع درجه ۲ هستند.

متأسفانه به علت چرای بی‌رویه دامها مراتع در حال تخریب هستند و از وسعت آنها کاسته می‌شود.

ب- گیاهان و بوته‌ها و درخچه‌های پراکنده: این نوع پوشش گیاهی نیز شامل دو قسمت است.

۱- منطقه شمال و شمال شرقی که کوهستانی هستند و گیاهان موجود بیشتر شامل گونه‌هایی از قبیل انواع گون، قیاق، پیاز کوهی، فرز، درمنه، خارشتر، بارهنگ، ورک، اسپند، پونه، قارچ، زرشک معمولی است و به آن زرک می‌گویند، قسنی، استادقدوس، قرپچ (که قبلاً به عنوان ماده‌ای برای شستشو استفاده می‌شده است)، نخود دحشی، بومادران و... است.

نوعی گون به نام *Astragalus siliquosus* در شیب شمالی کوه شاه جهان از طرف روستای در پرچین در ارتفاعات ۲۵۰۰-۱۷۰۰ متر مشاهده می شود. [۳] گون از نظر اقتصادی حایز اهمیت خاصی است و همه ساله مقدار قابل توجهی کتیرا از آن به دست می آید.

۲ - منطقه جنوب و جنوب غربی که شامل تپه ماهور و تپه های نسبتاً مرتفع هستند. گیاهان موجود در این منطقه شامل گونه هایی مثل، درمنه، تلخه بیان، خار زرد و خار بادبر، بومادران، سالیکورنیا و سالسولا، اسپند، درمنه دشتی، بادبرو ... می باشد.

قسمتهایی از مراتع شمالی از جمله اطراف روستای سارمران و ارتفاعات شاه جهان به دلیل وجود شکار فراوان از زمان رژیم گذشته حفاظت شده اعلام شده است.

شهرستان اسفراین به دلیل موقعیت جغرافیایی و وجود مراتع و جنگلهای پراکنده زیستگاه مناسبی برای حیوانات وحشی است. عمده ترین آنها عبارتند از:

شغال، گورکن و خرگوش که بیشتر در دشتهای دیده می شوند.

- آهو، روباه، گرگ، گراز، که هم در دشتهای و هم در ارتفاعات زندگی میکنند.

- قوچ و میش وحشی، بزکوهی، سمور، گربه وحشی، پلنگ، تشی و کفتار که بیشتر در ارتفاعات به ویژه ارتفاعات سالوک زندگی میکنند. همه این حیوانات تحت حفاظت اداره محیط زیست اسفراین هستند.

علاوه بر حیوانات فوق، انواع مختلف مار از جمله افعی و کبری، انواع پرندگان همچون، جغد، چوب پا، بوف، سبزقا، زاغی، کبک، تیهو، زنبور خور، قرقاول، پرستو، لاشخور، انواع گنجشک، انواع بلبل، بلدرچین، سینه سرخ، و غیره نیز در اسفراین وجو دارند.

حیواناتی مثل خوک و گرگ همه ساله خسارات زیادی به دامداران و کشاورزان وارد می‌آورند.

به طور کلی منابع آب تامین کننده آبهای ناحیه اسفراین بارندگی است و به ویژه از طریق ذوب برف دامنه‌های جنوبی ارتفاعات آلاداغ و شاه جهان ناشی می‌شود. با توجه به ویژگی بارشها، آبهای جاری غالباً به صورت سیلابهای فصلی و اتفاقی ظاهر می‌شوند. شبکه‌های دایمی به قسمتهای شمالی ذذشت محدود می‌شود و فقط رودخانه‌های بیدواز و روئین دارای جریان همیشگی هستند. ذوب برف در ارتفاعات شمالی و نفوذ تدریجی آندر خلل و فج و شکستگیهای تشکیلات زمین شناسی سفره آبهای زیر زمینی را تغذیه میکند.

۲-۲: روش اجرا

روستاهای مورد مطالعه:

تعداد چهار روستا شامل کلاته رضا، اسماعیل آباد، کلاته شور و حسین آباد از شهرستان اسفراین انتخاب گردید و در آنها به فواصل هر ۱۵ روز یکبار از اماکن داخلی و خارجی روستاها کار جمع آوری و صید پشه خاکی ها انجام گردید. برای صید پشه خاکی ها از تله های چسبان استفاده گردید. در هر بار مراجعه جهت صید پشه خاکی ها، تعداد ۳۰ تله چسبان در اماکن داخلی و ۳۰ تله چسبان در اماکن خارجی و ورودی لانه های جوندگان قرار داده می شد. در مجموع در هر بار مطالعه در منطقه ۱۲۰ تله چسبان در اماکن داخلی و ۱۲۰ تله چسبان در اماکن خارجی و لانه های جوندگان نصب می گردید. صید پشه خاکی ها از خرداد ماه ۱۳۹۲ آغاز و در آبان ماه همان سال خاتمه یافت.

مواد لازم برای صید و بررسی پشه خاکی ها شامل کاغذ A4، چوب های دو سر تیز به طول ۳۵ سانتی متر و قطر ۵ میلی متر، روغن کرچک، قلم مو، سرنک انسولین، برچسب، الکل اتانول ۹۶٪، یونولیت، مازیک مخصوص نوشتن

روی لام، پنبه، شیشه های پنی سیلین خالی، آب مقطر، چسب نواری، محلول پوری، جعبه لام، لام و لامل، ریل چوبی، میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری، گزیلول، لاکتوفنل، مداد مشکی، دماسنج، رطوبت سنج، میکروسکوپ و لوپ بودند.

پشه خاکی ها از اماکن داخلی (اتاق نشیمن، اتاق خواب، هال و پذیرایی، حمام و توالت) و خارجی (سوراخ های ایجاد شده در صخره ها و کوهها، زیر تخته سنگها) و لانه جوندگان با نصب تله های چسبان (کاغذهای سفید آغشته به روغن کرچک با ابعاد ۲۲ × ۱۵ سانتی متر) اقدام به صید پشه های خاکی گردید. برای این منظور کاغذهای A4 را به دو قسمت مساوی تقسیم کرده و آنها را با روغن کرچک آغشته نموده و سپس میله های چوبی از قبل آماده شده را از وسط آنها رد کرده و تله های یاد شده را قبل از غروب آفتاب در محل های مناسب اماکن داخلی (۳۰ عدد تله چسبان) و اماکن خارجی (۳۰ عدد تله چسبان) قرار داده و صبح روز بعد قبل از طلوع آفتاب آنها را جمع آوری نمودیم. سپس پشه خاکی های صید شده را با استفاده از سوزنهای تشریح حشره شناسی برداشته و به داخل الکل ۹۶٪ قرار داده و آنها را تا زمان بررسی های مولکولی و تشخیص گونه در داخل فریزر ۲۰- نگهداری کردیم. در زمان صید پشه خاکی ها، مشخصات محل جمع آوری از قبیل نام روستا، نوع مکان صید (داخلی، خارجی، لانه جونده)، تاریخ صید، رطوبت نسبی و درجه حرارت محل صید یادداشت شده و ثبت می گردید. برای تشخیص نمونه ها از کلید راثنی و حنفی بجد (۸۵) استفاده گردید (شکل ۲-۲).



شکل ۲-۲: مراحل نمونه و تشخیص پشه خاکی ها. آزمایشگاه لیشمانیوز، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۹۲

بررسی آلودگی انگلی پشه خاکی های صید شده به روش مولکولی:

قبل از استخراج DNA از پشه خاکی ها، سر و انتهای بدن پشه خاکی های ماده از بدن جدا گردید و با استفاده از محلول پوری نمونه شده تا تعیین هویت گردند و همچنین وضعیت شکمی آنها ثبت شد، بقیه بدن در تیوپ به صورت ۱۰ تایی قرار داده شدند. لازم به ذکر است پشه خاکی هایی که گونه و وضعیت شکمی یکسانی داشتند در دسته های ۱۰ تایی قرار داده شدند و مراحل استخراج DNA و PCR بر روی آنها انجام گردید.

استخراج DNA :

به منظور استخراج DNA، از کیت استخراج DNA از بافت (Qiagen, Korea)، سمپلر در سائز های برداشت مختلف، سرسمپلر زرد و کریستالی، بن ماری، اتوکلاو، میکروسانتریفیوژ، پستل (Pestle)، ورتکس، تیوب در اندازه های ۰/۲، ۰/۵ و ۱/۵ میلی لیتری، اتانول و پنبه استفاده گردید.

مراحل استخراج DNA از نمونه پشه خاکی با کیت Qia gen به صورت زیر بوده است :

۱- تعداد ۱۰ عدد پشه خاکی ماده از یک گونه را داخل میکرو تیوب ۱/۵ سی سی درب دار با استفاده از پستل له کردیم و مقدار ۱۲۰ میکرولیتر بافر ATL به آن اضافه کردیم .

۲- مقدار ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K به آن اضافه کردیم. با ورتکس آن را به خوبی مخلوط کردیم و در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد (بن ماری) به مدت ۳ ساعت آن را حرارت دادیم. در طول این مدت یک یا دو مرتبه آن را ورتکس کردیم.

۳- برای مدت ۱۵ ثانیه تیوب ها را ورتکس کردیم و بعد مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر AL به نمونه ها اضافه کرده و آنها را دوباره ورتکس کردیم.

۴- مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ (محصول شرکت مرک) به نمونه ها اضافه کرده و آنها را بخوبی ورتکس کردیم.

۵ - مخلوط را با سمپلر درون تیوب های فیلتردار ۲ میلی لیتری ریخته و مخلوط ها را در دستگاه سانتریفیوژ به مدت یک دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کردیم. لوله را جمع آوری و ماده زیرین آن را دور ریختیم.

۶ - در داخل همان تیوب فیلتردار قبلی روی ستون فیلتردار مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر AW1 اضافه کرده و مدت یک دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کردیم. لوله را جمع آوری و ماده زیرین آن را دور ریختیم.

۷- در داخل همان تیوب فیلتردار قبلی روی ستون فیلتردار مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر AW2 اضافه کرده و مدت سه دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می کردیم. لوله را جمع آوری و ماده زیرین آن را دور ریختیم.

۸- ستون فیلتردار را به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل کرده و مقدار ۵۰ میکرولیتر بافر AE (الوشن بافر) برای شستشو به آن اضافه کردیم. مخلوط را به مدت یک دقیقه در دمای اتاق نگه داشته و سپس به مدت یک دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه آن را سانتریفیوژ کردیم.

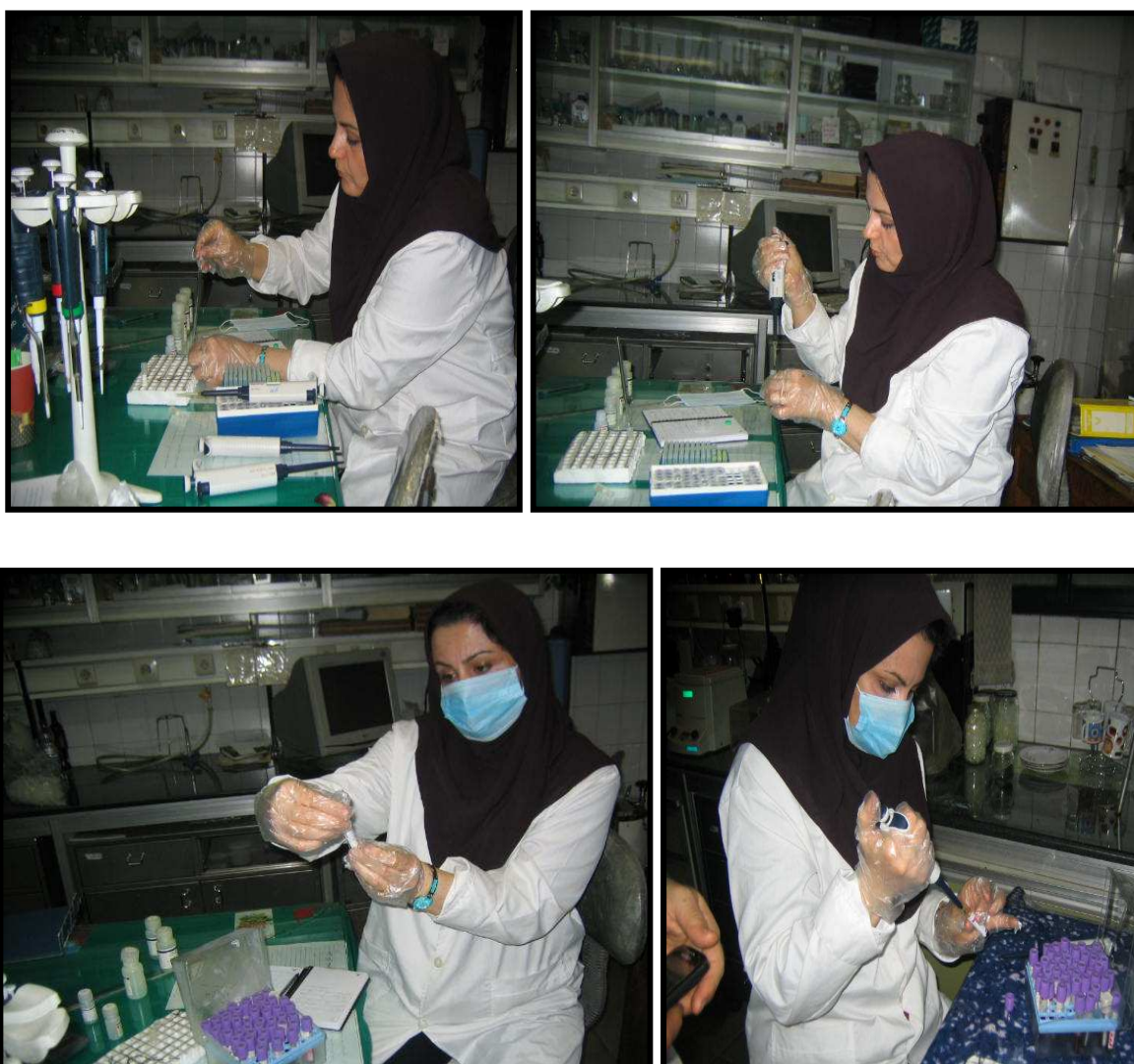
در پایان این مرحله، ماده ته تیوب محصول استخراج DNA نمونه می باشد که درب آن را محکم بسته و جهت انجام PCR آن را در دمای معمولی یخچال قرار دادیم.

در تکنیک PCR هر سیکل شامل سه مرحله است :

۱- مرحله Denaturation: در این مرحله DNA در دمای ۹۶-۹۴ درجه سانتیگراد به صورت تک رشته ای در می آید.

۲- مرحله Annealing: در این مرحله که دمای آن ۶۵-۵۰ درجه سانتیگراد می باشد ، پرایمر، جایگاه اتصال خود را شناسایی می کند و توسط پیوندهای هیدروژنی به جایگاه خود متصل می شود.

۳- مرحله Extension: در این مرحله که در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد اتفاق می افتد، DNA پلی مراز باعث تکثیر قطعه مکمل از انتهای ۳ پرایم هر کدام از پرایمرها می شود. با تکرار این سیکل، DNA تکثیر یافته و قطعه حدوداً دو پرایمر در حد میلیون ها کپی و تا حد میکروگرم DNA تکثیر می یابد. در تکنیک PCR قطعه مورد نظر برای تکثیر انتخابی است و ما می توانیم آن را توسط پرایمر تعیین کنیم و بقیه DNA بدون تکثیر باقی می ماند (شکل ۲-۳).



شکل ۲-۳ : مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت های کیا ژن و تکاپو زیست ، آزمایشگاه بیولوژی مولکولی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۹۲

بررسی مخازن بیماری لیشمانیوز جلدی

برای تعیین مخازن بیماری، ۴ روستای کلاته رضا، اسماعیل آباد، کلاته شور و حسین آباد از شهرستان اسفراین انتخاب گردید و در هر روستا در اماکن خارجی (سوراخ لانه جوندگان) و به خصوص در اطراف روستا تله گذاری انجام گردید. از خرداد ماه تا آبان ماه هر ماه دو بار با توجه به وسعت کلنی ها ۲۰ تا ۳۰ تله زنده گیر شرمین با طعمه های آبدار (خیار - گوجه فرنگی) و خشک (مغز گردو) در فصول مختلف به هنگام غروب نصب و صبح روز بعد جمع آوری شدند. تله های دارای موش به آزمایشگاه منتقل شده و با استفاده از کلیدهای تشخیصی (Etemad, ۱۹۷۸) گونه آنها تعیین گردید. از همه نمونه های صید شده جوندگان لام تهیه گردید. از اندامهای آلوده بخصوص گوش آنها به روش تماس بافتی با سطح لام گسترش تهیه گردید. همه گسترش های تهیه شده با محلول گیمسا رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ دوچشمی و با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه هایی که دارای انگل بودند به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفته و با روش های مناسب PCR میزان آلودگی آنها به انگل های لیشمانیا مورد مطالعه قرار گرفت. در روش های مولکولی، همه مراحل شبیه مراحل بیان شده برای پشه خاکی ها می باشد جز اینکه در مورد جوندگان سطح روی لام ها تراشیده شده و به تیوبهای ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده و سپس مراحل مولکولی ذکر شده تکرار گردید.



شکل ۲-۴: جوندگان صید شده و مراحل نمونه برداری از آنها، حیوانخانه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۹۲

بررسی پلی مورفیسم اینتر لوکین ۴ (IL4) در بیماران لیشمانیوز با تظاهرات کلینیکی مختلف:

جهت گرفتن نمونه خون انسان، پنجاه نفر انتخاب و در پنج گروه طبقه بندی شدند:

- ۱- بیماران با زخم های وسیع سالک (قطر طولی زخم بیش از ۳ سانتی متر)
- ۲- بیماران با زخم های کوچک و متوسط سالک (قطر طولی زخم کمتر از ۱ سانتی متر)
- ۳- بیماران با طول دوره درمان بیشتر از ۲ ماه (۲-۶ ماه)
- ۴- بیماران با طول دوره درمان کمتر از ۲ ماه
- ۵- افراد سالم

نمونه پس از استخراج DNA با استفاده از کیت های تکاپو زیست، جهت تعیین پلی مرفیسم در ژن اینترلوکین IL-4 به کمک پرایمرهای جلودار با توالی '5'-TGG GGA AAG ATA GAG TAA TA-3' و عقبدار با توالی '5'-TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT-3' مورد آزمایشات مولکولی PCR قرار گرفتند. محصولات PCR جهت توالی نوکلئوتید به شرکت تکاپو زیست (Bioner کره) ارسال شد و نتایج با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مورد آنالیز قرار گرفت.

نمونه گیری از زخم موارد انسانی مثبت لیشرمانیوز:

همزمان با خونگیری از موارد مثبت انسانی به انگل لیشرمانیا، نمونه گیری از زخم تازه ۴۰ بیمار دارای زخم لیشرمانیوز انجام شد. تعیین آلودگی آنها به انگل لیشرمانیا به روش مولکولی بر حسب ژن های هدف ITS1 و kDNA پیگیری شد. از کناره های زخم های تازه و فعال با استفاده از واکسینواستیل یا تیغه اسکالپل نمونه برداری می شد. از هر نمونه لام مستقیم تهیه و پس از رنگ آمیزی با گیمسا با درشتنمایی ۱۰۰۰× میکروسکوپ نوری از نظر اجسام لیشرمانیوز مورد بررسی قرار گرفت. لام های مثبت از نظر انگل لیشرمانیا به روش های kDNA PCR - NESTED و ITS1 PCR- RFLP تعیین هویت گردیدند.

روش الکتروفورز روی ژل آگارز:

برای انجام این کار مواد زیر مورد نیاز بود:

بافر الکتروفورز (TBE buffer)، سمپلر و سر سمپلر با قابلیت حجم ۱۰۰ - ۰/۵ میکرولیتر آگارز، سیستم الکتروفورز شامل تانک، شانه، گیره، سینی و منبع تغذیه برق، اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide)، بافر رهنما، ترازو، هیتر برقی دارای همزن، ساینر مارکر (DNA Size marker)، محافظ صورت از جنس پلک، دستگاه مجهز جهت تولید نور ماوراء بنفش (UV Transilluminator)، استوانه مدرج و دستکش یکبار مصرف.

در تهیه ژل باید دقت شود که هرچه تعداد جفت باز های DNA محصول PCR بیشتر باشد، غلظت ژل را باید کمتر در نظر گرفت تا حرکت جفت باز ها در داخل ژل به آسانی صورت پذیرد و هرچه تعداد جفت بازهای محصول PCR کمتر باشد، غلظت ژل تهیه شده باید زیادتر باشد.

برای محصولات کمتر از ۴۰۰bp ژل با غلظت ۲٪ و برای محصولات حدود ۸۰۰-۶۰۰bp ژل ۱٪ تهیه می شد. برای تهیه ژل ۱٪ مقدار ۰/۳ گرم آگارز را در ۳۰ میلی لیتر محلول TBE 1X حل می کردیم و با استفاده از شعله آتش، محلول به رنگ شفاف در می آید. محلول باید به دفعات به هم زده می شد تا کاملاً حل و شفاف می گردید. سپس محلول را به آرامی سرد کرده و وقتی دمای آن به حدود ۵۰ درجه سانتیگراد رسید، به آن مقدار ۲ میکرولیتر اتیدیوم بروماید اضافه می میکردیم، سپس آن را در قالب های موجود که شانه ای در آن قرار داده بودیم، ریخته و مدتی صبر می کردیم تا ژل بسته شود. بعد از آن، شانه را به آرامی از داخل ژل بیرون می آوردیم. ژل را که دارای چندین چاهک بود، داخل تانک الکتروفورز گذاشته و درون تانک محلول TBE 1X تازه می ریختیم تا سطح ژل کاملاً در آن غوطه ور شود.

به دلیل اینکه از Premix جهت PCR استفاده می شد، در ران کردن محصولات PCR از بافر انتقال دهنده استفاده نمی شد و مقدار لازم از محصول را به چاهک ها انتقال می دادیم. درون اولین چاهک به میزان ۵ میکرولیتر ساینر مارکر DNA مناسب (۱۰۰bp) می ریختیم. در چاهک دوم از محصول PCR کنترل مثبت، در چاهک سوم کنترل منفی و در چاهک های بعدی از محصول PCR نمونه های موجود ریخته شده و در انتقال آنها به داخل چاهک ها دقت لازم صورت می گرفت تا از انتشار آنها در داخل بافر جلوگیری شود. بعد از انتقال محصولات PCR به داخل چاهک ها با استفاده از دستگاه جریان برق، جریان الکتریکی در حدود ۱۲۰ ولت جهت حرکت نمونه ها از چاهک ها به طرف داخل ژل برقرار می شد. پس از مدت ۵ دقیقه و مشخص شدن مسیر رانش، ولتاژ را به ۸۰ ولت کاهش می دادیم. رانش محصولات PCR حدود ۴۰ دقیقه به طول می انجامید.

بعد از پایان مدت زمان الکتروفورز، جریان برق را در تانک قطع می کردیم و ژل آگارز را به آرامی و با احتیاط و با پوشیدن دستکش از داخل تانک برداشته و به روی دستگاه تابش اشعه ماوراء بنفش (UV Transilluminator) منتقل می کردیم. با تابش اشعه UV، باندهای ایجاد شده رویت و با مارکر استفاده شده مورد مقایسه قرار می دادیم.

در صورت لزوم از ژل آگارز و باندهای تشکیل شده توسط دستگاه Gel Photodocumentary عکس تهیه می کردیم.



شکل ۲-۵: مراحل انجام PCR و الکتروفورز، آزمایشگاه بیولوژی مولکولی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۹۲

در این بررسی روش های مولکولی زیر برای تشخیص آلودگی انگلی پشه خاکی ها و جوندگان مورد استفاده قرار گرفت:

تعیین آلودگی با استفاده از تکثیر حلقه های کوچک kDNA کینتوپلاست:

در این مطالعه، برای تشخیص آلودگی لپتومونادی پشه خاکی ها و تعیین هویت انگل جدا شده از جونده و انسان از روش حساس Nested PCR استفاده گردید و بدین منظور از پرایمرهای طراحی شده توسط Noyes و همکاران (۱۴۲) استفاده شد. این پرایمرها بر اساس ناحیه حفاظت شده حلقه های کوچک kDNA (Minicircle) طراحی شده و برای انگل های *Leishmania infantum* و *Leishmania donovani* محصول PCR به طول ۷۵۰ bp و برای انگل *L. major* طول باند ۵۶۰ bp ایجاد می نماید. پرایمرهایی که جهت خرید سفارش داده می شد، به صورت لیوفیلیزه بودند، این پرایمرها به همراه یک Data sheet عرضه می شدند که اطلاعات لازم جهت رقیق سازی در Data sheet ارائه شده بود. معمولاً پرایمرهای stock با غلظت ۱۰۰ میکرومول و پرایمرهایی که جهت کار روزانه استفاده می شدند با غلظت ۱۰ میکرومول تهیه می شد. شایان ذکر است که جهت رقیق سازی از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده می شد.

جدول ۱-۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر حلقه های کوچک KDNA کیتوپلاست (۱۴۲)

نام پرایمر	توالی	عملکرد در واکنش	طول پرایمر
CSB2XF	5'-CGAGCAGAACTCCCGTTCA-3'	Forward	20
CSB1XR	5'-ATTTTCGCGATTTTCGCAGAACG-3'	Reverse	24
13Z	5'-ACTGGGGGTTGGTGTAATAAG-3'	Forward	22
LIR	5'-TCGCAGAACGCCCT-3'	Reverse	15

مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- پرایمرهای Reverse & Forward

۲- DNA الگو

۳- کیت مخصوص PCR (Premix)

۴- دستگاه سمپلر در اندازه های مختلف و سر سمپلر با حجمهای مناسب با سمپلر

۵- دستگاه ترموسایکلر

۶- آب مقطر دو بار تقطیر

۷- میکروسانتریفوژ

آماده کردن مخلوط اصلی یا (Reaction buffer/Master Mix):

برای تهیه مخلوط باید حجم هر واکنش را مشخص نمود هر واکنش PCR در حجم ۲۰ الی ۲۰۰ میکرولیتر قابل انجام است. عامل مهم برای انتخاب حجم، کارایی دستگاه و نحوه برنامه ریزی دستگاه PCR است. نکته مهم انتقال دما در داخل لوله آزمایش است که هر چه حجم واکنش کمتر باشد زمان کمتر برای یکنواخت شدن دما در داخل لوله نیاز است. در این مطالعه حجم واکنش در مرحله اول ۲۰ میکرولیتر و برای مرحله دوم ۳۰ میکرولیتر بود. جهت یکنواخت شدن Master Mix برای تمامی نمونه های مورد بررسی معمولاً یک Master Mix واکنش کلی به تعداد کل نمونه های مورد بررسی تهیه می شد. در هر بار انجام واکنش لازم بود یک نمونه کنترل منفی جهت تست عدم وجود آلودگی به کار برده شود. کارکرد صحیح واکنش با استفاده از *L.major* DNA به عنوان کنترل مثبت ارزیابی می شد. در هنگام تهیه Master Mix مقدار کلی Master Mix را بر اساس مجموع تعداد کل نمونه های مورد تست به همراه یک نمونه منفی، یک نمونه مثبت و یک نمونه اضافی محاسبه می شد. در نظر گرفتن نمونه اضافی به این دلیل است که در جریان تقسیم مخلوط اصلی در میکروتیوبهای مخصوص واکنش PCR مقداری از مخلوط اصلی در طی انتقال از دست می رود پس نیاز است که یک نمونه اضافی در نظر بگیریم تا برای آخرین نمونه Master Mix به مقدار کافی داشته باشیم. مقدار Master Mix که برای ۱۰ عدد

نمونه تهیه می شود در عمل برای ۷ عدد نمونه تست ، یک عدد کنترل منفی و یک عدد کنترل مثبت مورد استفاده قرار می گرفت . در صورت نیاز برای تهیه Master Mix برای تعداد بیشتر نمونه به نسبت مورد نیاز Master Mix اضافی تهیه می شد. در هنگام تهیه Master Mix مقدار مورد نیاز از آب مقطر را در داخل تیوب Master Mix ریخته و سپس پرایمرها اضافه می شدند . بعد از سانتریفوژ کوتاه حجم مورد نیاز از Master Mix به داخل تیوبهای تست (Premix) که از قبل شماره گذاری شدند منتقل می گردید . سپس برای هر نمونه DNA مورد نیاز را اضافه کرده ، پس از سانتریفوژ کوتاه داخل دستگاه ترموسایکلر گذاشته ، برنامه مورد نظر در دستگاه PCR را فعال نموده و بعد از اتمام مراحل PCR نمونه ها به داخل یخچال منتقل می شد.

تهیه مخلوط اصلی (Master mix) به منظور تکثیر حلقه های کوچک kDNA کیتوپلاست:

مخلوط اصلی مرحله اول Nested PCR:

به دلیل اینکه ما در طی مراحل PCR از Premix استفاده می کردیم و کیت های لیوفیلیزه Premix حاوی 10X PCR buffer، DNTps mix، $MgCl_2$ و Tag DNA Polymerase می باشند. بنابراین Master mix فقط حاوی Forward Primer 1 μ l، Reverse Primer 1 μ l، DNA 3 μ l و DDH_2O 7/5 μ l بوده است. در مرحله اول واکنش Nested PCR از پرایمرهای **CSB1XR** و **CSB2XF** استفاده شد. پس از تهیه Master mix سانتریفوژ کوتاه انجام شده و مقدار مورد نیاز از آن را داخل تیوب های لیوفیلیزه Premix ریخته و سپس برای هر نمونه DNA مورد نیاز را اضافه کرده ، پس از سانتریفوژ کوتاه داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده ، برنامه مورد نظر در دستگاه PCR را فعال می کردیم. واکنش های PCR توسط دستگاه Thermocycler با مشخصات Eppendorf مدل Personal به ظرفیت 16 تیوب 0.5 ml و 25 تیوب 0.2 ml انجام شد.

جدول ۲-۲: تهیه مخلوط اصلی و مقادیر مورد نیاز به منظور تکثیر حلقه های کوچک KDNA کینتوپلاست در مرحله اول NESTED PCR

نوع ماده	غلظت موجود	غلظت مورد نیاز	حجم مورد نیاز (μ l)
Premix(Amplicon)	2x	1x	12.5
Forward Primer	10 μ M	1 μ M	1
Reverse Primer	10 μ M	1 μ M	1
Template DNA			3 μ l(5-10ng)
DDH ₂ O	-----	-----	7.5
Final volume for one tube	-----	-----	25

جدول ۲-۳ سیکل‌های حرارتی مرحله اول واکنش NESTED PCR

No	نام مرحله	مرحله اول واکنش	
		دما	زمان
1	Preheating	94	2 min
2	Denaturation	94	30 s
3	Annealing	54	30 s
4	Extention	72	90 s
5	Repeat 2 to 4 cycles	35 cycles	

مخلوط اصلی مرحله دوم Nested PCR:

کمی قبل از اتمام مرحله اول واکنش مخلوط اصلی (Master Mix) مرحله دوم تهیه می شد. در این مرحله نیز همانند مرحله قبل یک مخلوط برای کل واکنش تهیه کرده و به مقدار حجم مورد نیاز برای هر تیوب اضافه شد. تفاوت مخلوط اصلی مرحله دوم با مرحله قبل در نوع پرایمر ها می باشد. که از پرایمر های **13Z** و **LIR** استفاده شده است. همچنین به جای DNA مقدار 5 میکرو لیتر از محصول PCR مرحله اول استفاده می شد. لازم به یادآوری است که در این مرحله حجم کل واکنش ۳۰ میکرو لیتر بود.

جدول ۲-۴: تهیه مخلوط اصلی و مقادیر مورد نیاز به منظور تکثیر حلقه های کوچک KDNA کینتوپلاست در مرحله دوم NESTED PCR

نوع ماده	غلظت موجود	غلظت مورد نیاز	حجم مورد نیاز (μ l)
Premix(Amplicon)	2x	1x	15
Forward Primer	10 μ M	1 μ M	1
Reverse Primer	10 μ M	1 μ M	1
PCR product			5 μ l(5-10ng)
DDH ₂ O			8
Final volume for one tube			30

جدول ۲-۵: سیکل‌های حرارتی مرحله دوم واکنش NESTED PCR

No	نام مرحله	مرحله دوم واکنش	
		دما	زمان
1	Preheating	94	2 min
2	Denaturation	94	30 s
3	Annealing	56	1 min
4	Extention	72	40 s
5	Repeat 2 to 4 cycles	35 cycles	
6	Final Extention	72	10min

بعد از انجام مراحل بالا نمونه ها را به داخل یخچال منتقل کرده و پس از آماده کردن ژل محصول PCR را در

محیط آگارز ۱ درصد الکتروفورز کرده و نتایج مورد ارزیابی قرار می گرفت.

تعیین آلودگی با استفاده از تکثیر rDNA به روش Conventional PCR :

تکثیر حلقه های کوچک KDNA از لحاظ مثبت شدن انگل و نشان دادن آلودگی خیلی مناسب است اما بدلیل اینکه در تعیین گونه انگل بدین روش جای تردید وجود دارد و از طرفی به لحاظ متغیر بودن ماهیت ژنتیکی Minicirle و تفاوت هایی که حتی در حلقه های یک انگل لیشمانیا وجود دارد تعیین توالی این بخش از ژنوم انگل سخت یا امکان پذیر نمی باشد. در این مطالعه به منظور تعیین هویت گونه های انگل لیشمانیا، از ژن rDNA که بخشی از ژنوم هسته است استفاده شده است. در این تحقیق پس از اینکه آلودگی لپتومونادی گونه های پشه خاکی ها با روش Nested PCR روی ژنوم KDNA بررسی گردید. ژن rDNA نمونه های مثبت به روش Standard PCR تکثیر گردید. پرایمر های مورد استفاده LITSR و L5.8S بودند که قطعه ITS1 را در تمام گونه های لیشمانیا تکثیر می کند. و باند ایجاد شده برای تمام گونه های انگل لیشمانیا بین ۳۵۰-۳۰۰ bp می باشد. مشخصات پرایمر های مورد استفاده در جدول (۲-۶) آورده شده است.

جدول ۲-۶ توالی پرایمر های مورد استفاده در تکثیر ژن ITS1

نام پرایمر	توالی	عملکرد در واکنش	طول پرایمر
LITSR	5'CTGGATCATTTTCCGATG3'	Forward	18
L5.8S	5'TGATACCACTTATCGCACTT3'	Reverse	20

جدول ۷-۲: تهیه مخلوط اصلی (MASTER MIX) به منظور تکثیر DNA به روش CONVENTIONAL PCR

نوع ماده	غلظت موجود	غلظت مورد نیاز	حجم مورد نیاز (μl)
Premix(Amplicon)	2x	1x	12.5
Forward Primer	10μM	1μM	2
Reverse Primer	10μM	1μM	2
Template DNA			3 μl(5-10ng)
DDH ₂ O			5.5
Final volume for one tube			25

به دلیل اینکه ما در طی مراحل PCR از Premix استفاده می کردیم و کیت های لیوفیلیزه Premix حاوی 10X PCR buffer، MgCl₂، DNTPs mix و Taq DNA Polymerase می باشند بنابراین Master mix فقط حاوی 2μl Forward Primer، 2μl Reverse Primer و 5.5μl DDH₂O بوده است پس از تهیه Master mix سانتریفوژ کوتاه انجام شده و مقدار مورد نیاز از آن را داخل تیوپ های لیوفیلیزه Premix ریخته و سپس برای هر نمونه 3μl DNA را اضافه کرده ، پس از سانتریفوژ کوتاه داخل دستگاه ترموسایکلر قرار می دادیم (جدول ۷-۲). در جدول ۸-۲ سیکل های حرارتی واکنش تکثیر ملاحظه می گردد.

جدول ۲-۸ سیکل‌های حرارتی واکنش تکثیر rDNA به روش STANDARD PCR

No	نام مرحله	دما	زمان
1	Preheating	95	5 min
2	Denaturation	94	30 s
3	Annealing	48	30 s
4	Extention	72	1 min
5	Final Extention	72	7 min
6	Repeat 2 to 4 cycles	35 cycles	

تعیین توالی نمونه های مثبت شده از طریق ژن ITS1:

از آنجایی که با تکثیر rDNA باند ایجاد شده برای تمام گونه های انگل لیثمانیا بین ۳۵۰-۳۰۰ bp می باشد افتراق گونه ها غیر ممکن خواهد بود. بنابراین محصولات PCR نمونه هایی که ژن ITS آنها مثبت شده اند را تعیین توالی نمودیم. به منظور تعیین توالی نمونه ها، ۶۰µl از محصول PCR با کیفیت مناسب مربوط به تکثیر ژن هدف آماده و با همکاری شرکت تکاپو زیست به کشور کره ارسال گردید. همراه نمونه ها فرم مخصوص سفارش و مقداری پرایمر ارسال گردید. شرکت SeqLab نتایج سکونس نمونه ها را به صورت کروماتوگراف و توالی خطی ارائه نمود. در موارد مشکوک که ژن به درستی تعیین توالی نشده باشد با حرف N مشخص می گردد که این موارد با مقایسه با سایر توالی ها و نیز با توجه به منحنی کروماتوگراف نرم افزار Chromas بررسی و در حد ممکن تصحیح گردیدند.

مراحل انجام واکنش (RFLP) Restriction Fragment Length Polymorphism:

از آنجایی که توالی نوکلئوتید های DNA در همه نمونه ها یکسان نیست لذا الگوی حاصل از هضم DNA توسط آنزیم های محدود کننده یکسان نبوده و منجر به پلی مورفیسم متمایز در حین الکتروفورزمی گردد. آنزیم محدود کننده *HaeIII* باعث ایجاد برش در ژن تکثیر شده انگل لیشمانیا شده و می توان گونه های مختلف را تمایز داد. برای انجام این واکنش به ازای هر ۲۵ μL از حجم واکنش، واکنشگرهای زیر به نسبت با هم مخلوط شدند:



۱- محصول PCR تکثیر rDNA با کیفیت مناسب ۲۰ μL

۲- بافر مخصوص آنزیم ۲/۵ μL

۳- آنزیم محدود کننده *HaeIII* به میزان ۱ μL

۴- آب مقطر ۱/۵ μL

بعد از تهیه مخلوط اصلی آن را سانتریفوژ کوتاه کرده و سپس ۱۰ μL روغن معدنی (Mineral Oil) جهت جلوگیری از تبخیر اجزای واکنش به آن اضافه می شد. نمونه ها به مدت ۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می گرفت. بعد از اتمام واکنش ۱۰-۵ μL از محصول در ژل ۲/۵٪ الکتروفورز میگردید. در نهایت بعد از الکتروفورز از باندهای ایجاد شده عکس تهیه می شد.

مقایسه توالی ها (Alignment):

به منظور مقایسه توالی های نمونه های حاصل از مطالعه با همدیگر و نیز با توالی های موجود در Genebank از نرم افزار (www.ebi.ac.uk/clustalw) استفاده شده و درصد مشابهت و اختلاف بین نمونه ها و نمونه های

موجود در بانک جهانی ژن به دست آمد. همچنین جهت بررسی صحت توالی ها و تعیین هویت صحیح آنها از نرم افزار BLAST (www.ncbi.nih.gov.org/blast) موجود در Genebank استفاده شد.

بررسی پلی مورفیسم اینتر لوکین ۴ (IL-4) در بیماران لیشمانیوز:

پنجاه نمونه خون انسانی با تظاهرات مختلف از بیماری سالک پوستی و چند نمونه از افراد ساکن و سالم در منطقه آلوده که احتمالاً مورد گزش پشه خاکی آلوده بوده اند ولی فاقد زخم بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه ها جهت تعیین پلی مورفیسم در ژن اینترلوکین ۴-IL به کمک پرایمرهای جلودار با توالی 5'-TGG GGA AAG 3' و عقبدار با توالی 5'-TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT-3' انجام شد. محصولات PCR تعیین توالی شده با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیکی پلی مورفیسم ژنتیکی آنها مورد آنالیز قرار گرفت (۱۲۶).

با استفاده از ژن های ثبت شده در بانک جهانی ژن، محل دقیق پرایمرها و و محل دقیق SNP مورد نظر ما مشخص گردید. همان طور که در شکل ۲-۶ ملاحظه می شود، محل دقیق پرایمرها و توالی این پرایمرها به صورت قرمز رنگ نشان داده شده است. محل دقیق SNP نیز به رنگ سبز نمایش داده شده است. با توجه به شکل، مشاهده می شود، آنزیم Eco47I توالی های زیر را از محل فلش برش می دهد:

3'...C C W G↑G...5' و 5'...G↓G W C C...3'

در مطالعه ای که صورت دادیم، طبق مطالعه ای که سروستانی و همکاران به انجام رسانیده بودند، برنامه دمایی زیر برای انجام PCR به کار گرفته شد:

۳۵ سیکل و denaturation با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۵۰ ثانیه، Annealing با دمای ۵۳ درجه سانتیگراد و به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت Extension با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۵۰ ثانیه. برای انجام

PCR از پرایمرهای آماده intron استفاده گردید. بعد از انجام PCR، ۴ باند در ژل دو درصد مشاهده شد. یکی

از باندها حدود ۲۰۰ جفت باز بود که تقریباً شارپ بود. سه باند دیگر در حدود ۴۸۰ جفت باز، حدود ۵۲۰ جفت

باز و حدود ۶۰۰ جفت باز مشاهده گردید که با توجه به شکل ۶-۲، حدود ۲۰۰ جفت باز باند مورد نظر ما می باشد.

CCTGCTGGGACCCAACTAGGCTCACCTGATACGACCTGTCCTTCTCAAAACACC
 GGGGTAGGAGAGTCTGCCTGTTATTCTGCCTCTATGCAGAGAAGGAGCCCCAGATCAGCTTTTCCATGACAGGACAGTTTCCAAGAT
 GCCACCTGTACTTGGAAGAAGCCAGGTTAAATACTTTTCAAGTAAACTTTCTTGA
 ATTACAACAAATTCGGACACCTGTGGCCTCTCCCTTCTATGCAAAGCAAAAGCCAGCAGCAGCCCCAAGCTGATAAGATTAAATCTA
 AAGAGCAAATTATGGTGAATTTCTATGCTGAACTTTGTAGTTAATTTTTTAAAAAGGTTTCATTTTCTATGGTCTGATTTC
 CAGGAACATTTTACCTGTTTGTGAGGCATTTTTCTCCTGGAAGAGAGGTGCTGATTGGCCCCAAGTGACTGACAATCTGGTGTAA
 GAAATTTCCAATGTAACTCATTTCCCTCGGTTTCAGCAATTTTAAATCTATATATAGAGATATCTTTGTGAGCAT
 AGCTTCTCCTGATAAACTAATTGCCTCACATTGTCACTGCAAATCGACACCTATTAAATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCC
 CTCTGTCTCTCCTGCTAGC

PCR conditions used for determination of IL4 gene promoter polymorphism: 35 cycle: 94°C 50 s, 53°C 50 s, 72°C 50 s

PRIMERS: 5-taaactgggagaacatggt-3 5-tgggaaagatagagtaata-3 SNP UTR CDS

شکل ۶-۲: محل دقیق پرایمرهای Forward, Reverse، محل دقیق SNP مورد نظر ما، محل دقیق UTR و محل دقیق شروع CDS نشان داده شده است. سیکل دمایی مورد استناد نیز نشان داده شده است: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای denaturation، دمای ۵۳ درجه سانتیگراد برای annealing و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای extension. تمام این مراحل هر کدام در هر سیکل ۵۰ ثانیه و تعداد سیکل ها، ۳۵ سیکل است.

بعد از شناسایی دقیق محل پرایمرها و SNP و انجام PCR با شرایط ذکر شده، یکی از نمونه ها را ژل الکتروفورز ۲٪ تست کرده کرده و سپس باند ۲۰۰ جفت بازی را با استفاده از کیت استخراج از ژل Bioneer از ژل استخراج و برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال نمودیم که نتیجه نشان دهنده این بود که باند استخراج شده همان

باند مورد نظر ماست. پرایمرهای اختصاصی قطعه ای به طول ۱۹۵ جفت باز را تولید کردند. برای تعیین ژنوتیپ ها، بایستی واکنش PCR-RFLP انجام می شد ولی ساب باندها عامل اختلال در انجام این واکنش بودند. به همین دلیل با افزایش دمای annealing، ساب باندها تقریباً از ژل ناپدید گردیدند. به این منظور دمای ۵۳ درجه سانتیگراد به ۵۵ درجه سانتیگراد افزایش یافت. سپس DNA تمامی نمونه های خون با استفاده از کیت کیاژن استخراج گردید و سپس PCR با استفاده از پرایمرهای فوق الذکر و برنامه دمایی اصلاح شده به انجام رسید. در جداول ۲-۹ و ۲-۱۰ سیکل های حرارتی و مواد مورد جهت PCR ژن پروموتور اینترلوکین ۴ ملا حظه می گردد. در این مطالعه از آنزیم

Avall(Eco47I) استفاده شد

جدول ۲-۹ : سیکلهای حرارتی واکنش تکثیر P. IL4 به روش Standard PCR

No	نام مرحله	دما	زمان
1	Preheating	95	5 min
2	Denaturation	94	50 s
3	Annealing	55	50 s
4	Extention	72	50 s
5	Final Extention	72	5 min
6	Repeat 2 to 4 cycles	35 cycles	

جدول ۱۰-۲: تهیه مخلوط اصلی (MASTER MIX) به منظور تکثیر P.IL4 به روش STANDARD PCR

نوع ماده	غلظت موجود	غلظت مورد نیاز	حجم مورد نیاز (μ l)
Premix(Amplicon)	2x	1x	12.5
Forward Primer	10 μ M	1 μ M	1
Reverse Primer	10 μ M	1 μ M	1
Template DNA			3 μ l/(5-10ng)
DDH ₂ O			7.5
Final volume for one tube			25

فصل سوم

یافته ها و نتایج

۳-۱: ناقلین عوامل بیماری

۳-۱-۱: گونه های جمع آوری شده پشه خاکی

در طی این مطالعه تعداد ۲۳۰۵ عدد پشه خاکی صید شد. پشه خاکی های صید شده شامل ۵ گونه از دو جنس

Phlebotomus papatasi و *Sergentomyia* بودند. از جنس فلبوتوموس سه گونه *Phlebotomus*

Sergentomyia sintoni (۴۳/۴۳٪)، *P. salehi* (۷۴٪) و *P. causicus* (۲/۲۳٪) صید شدند. دو گونه

S. dentata (۱۱/۲۸٪) و (۴۲/۱۲٪) پشه خاکی های جمع آوری شده از جنس سرژنتومیا بودند (جدول ۳-۱).

جدول شماره ۳-۱ فراوانی و گونه صید شده در روستاهای مورد مطالعه

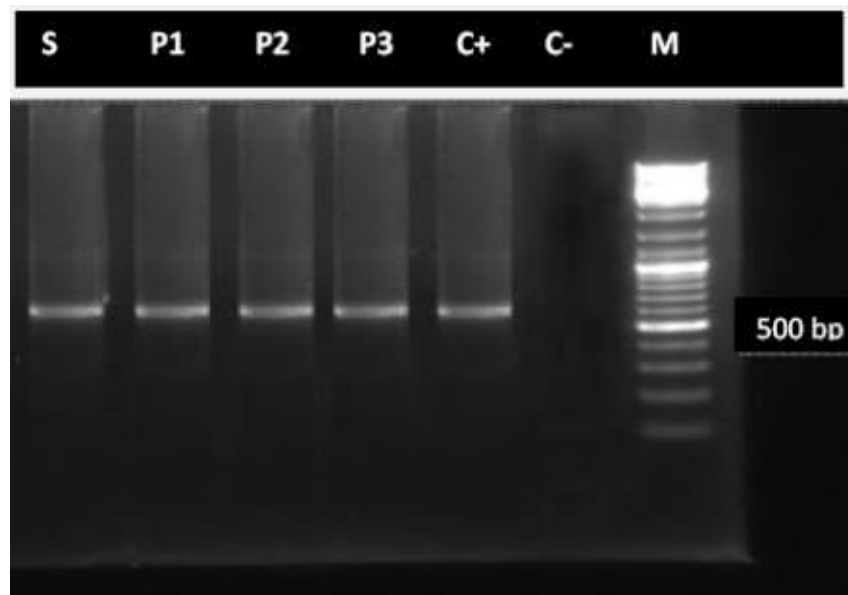
ردیف	گونه پشه خاکی محل صید	<i>P. papatasi</i>			<i>P. salehi</i>			<i>P. causicus</i>			<i>S. sintoni</i>			<i>S. dentata</i>		
		داخلی	خارجی	لانه چونده	داخلی	خارجی	لانه چونده	داخلی	خارجی	لانه چونده	داخلی	خارجی	لانه چونده	داخلی	خارجی	لانه چونده
1	کلاته شور	103	76	121	-	-	7	-	13	-	-	191	109	-	31	19
2	کلاته رضا	82	51	118	-	-	8	-	17	-	-	96	180	-	25	66
3	حسین آباد	140	61	49	-	-	-	-	14	-	-	120	92	-	27	28
4	اسماعیل آباد	65	41	95	-	-	2	-	10	-	-	110	73	-	35	30
	جمع کل	390	229	383	-	-	17	-	54	-	-	517	454	-	118	143

۳-۲: مطالعات مولکولی

۳-۲-۱ تشخیص اولیه آلودگی پشه خاکی ها به انگل لیشمانیا

مجموع ۳۹۰ پشه خاکی ماده با تست حساس Nested PCR با لوکوس kDNA از نظر آلودگی به انگل لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفت. پشه خاکی های تست شده شامل گونه های فلپوتوموس پاپاتاسی (۳/۵۱٪)، فلپوتوموس صالحی (۳/۴٪)، سرژنتومیا سینتونی (۸/۳۰٪) و سرژنتومیا دنتاتا (۶/۱۳٪) بودند. در بین پشه خاکی های تست شده فقط سه نمونه از گونه فلپوتوموس پاپاتاسی (۵/۱٪) و یک نمونه از گونه ف.صالحی (۹/۵٪) نسبت به انگل

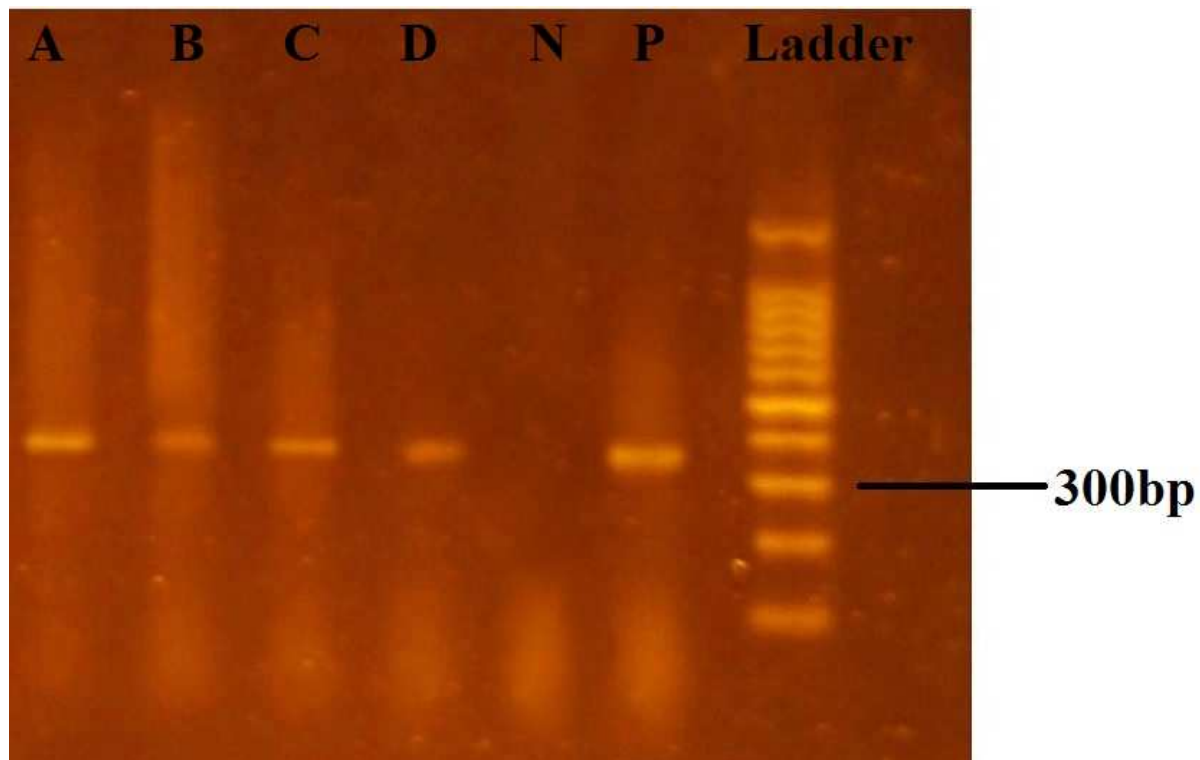
Leishmania major مثبت بودند و محصول PCR به اندازه ۵۶۰bp روی ژل آگاروز تشکیل دادند. یکی از نمونه های مثبت *Phlebotomus papatasi* مربوط به منطقه کلاته شور بود که از لانه جونده صید گردیده بود و آلوده به انگل *Leishmania major* تشخیص داده شد. نمونه دیگر مثبت *Ph.papatasi* مربوط به اسماعیل آباد و از لانه جونده صید گردیده بود. پس از دریافت نتایج توالی نوکلئوتید انگل مشخص شد که این نمونه دارای آلودگی میکس به انگل *Leishmania major* و *Leishmania turanica* داشت. نمونه بعدی نیز *Ph.papatasi* مربوط به منطقه حسین آباد بود که از محل مسکونی صید شده بود و آلوده به انگل *L.major* تشخیص داده شد. نمونه آخر مثبت مربوط به *Phlebotomus salehi* بود که از منطقه اسماعیل آباد و از لانه جونده صید شده بود و آلوده به انگل *L.major* تشخیص داده شد. (شکل ۳-۱)



شکل ۳-۱- الکتروفورز محصول PCR مربوط به لوکوس kDNA با استفاده از Nested PCR در نمونه های آلوده پشه خاکی به انگل *L. major* . L. سایز مارکر، C+ کنترل مثبت *L. major* (MHOM/IR/75/ER) ، P1- P3 انگل لیشمانیا ماژور درنمونه های *P. papatasi* آلوده به انگل لیشمانیا ماژور ، S انگل لیشمانیا ماژور درنمونه *P. salehi* آلوده به انگل لیشمانیا ماژور، C- کنترل منفی.

۳-۲-۲ تعیین هویت اولیه انگل های لیشمانیا در ناقلین عامل بیماری:

به لحاظ متغیر بودن ماهیت ژنتیکی Minicircle و تفاوت هایی که حتی در حلقه های یک انگل لیشمانیا وجود دارد، تعیین توالی این بخش از ژنوم انگل سخت یا امکان پذیر نمی باشد. بنابراین برای تعیین هویت انگل به تکثیر بخش Internal Transcribed Spacer (ITS) ژن ITS1-rDNA اقدام شد. به این منظور بعد از set کردن واکنش با انگل های کنترل مثبت، ۴ نمونه مثبت شده از طریق مولکول Minicircle نیز با این بخش بررسی شدند. از ۴ نمونه مورد بررسی همگی با بخش ITS1 مثبت گردید. در تکثیر این ژن از پرایمرهای عمومی ITS1 که تمامی گونه های جنس لیشمانیا را آمپلی فای می کند استفاده گردید. این پرایمرها محصول PCR به طول ۳۵۰ bp ایجاد کردند. در شکل شماره ۳-۲ الکتروفورز محصول PCR این ژن نشان داده شده است.



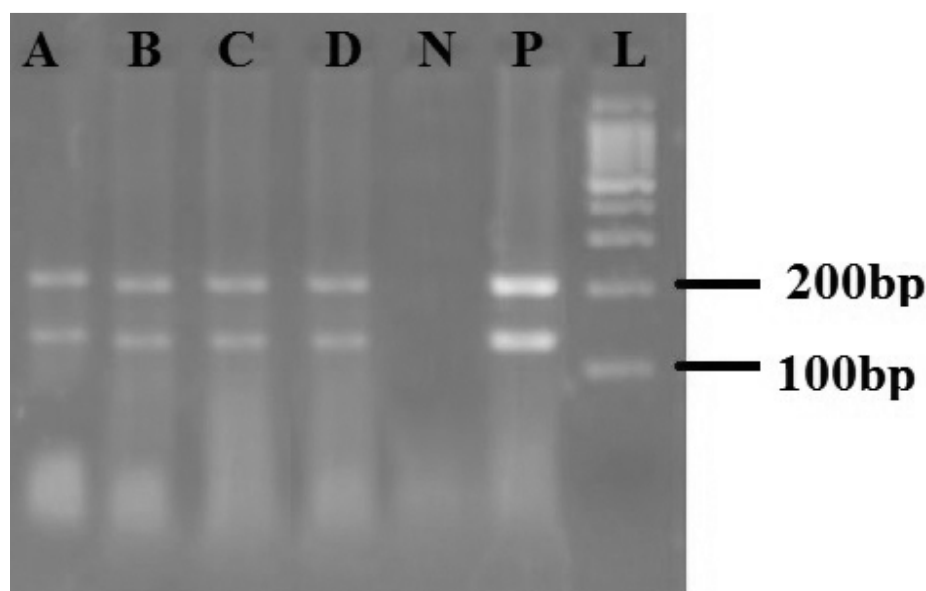
شکل شماره ۳-۲: الکتروفورز محصول PCR ژن ITS^۱ لاین های B,C نمونه های فلبوتوموس پاپاتاسی آلوده به انگل لیثمانیا ماژور. لاین A ، نمونه های فلبوتوموس پاپاتاسی آلوده به انگل لیثمانیا ماژور و تورانیکا . لاین D ، نمونه فلبوتوموس صالحی آلوده به انگل لیثمانیا ماژور، N کنترل منفی، P، کنترل مثبت *L.major* Ladder.(MHOM/IR/75/ER) سایز ماکر ۱۰۰ bp ساخت شرکت Fermentase.

۳-۲-۳ نتایج انجام واکنش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) با آنزیم

HaeIII

برای تأیید نهایی انگل، الکتروفورز محصول PCR-RFLP ناحیه ITS1 برای تشخیص گونه های لیشمانیا با استفاده از آنزیم HaeIII انجام گردید و باندهایی با قطعات ۲۲۰bp و ۱۴۰bp بر روی ژل ۲/۵ در صد الکتروفورز تشکیل گردید که تأیید کننده وجود انگل *L.major* در نمونه های آلوده *P.papatasi* و *P.salehi* بود. (شکل

(۳-۳)



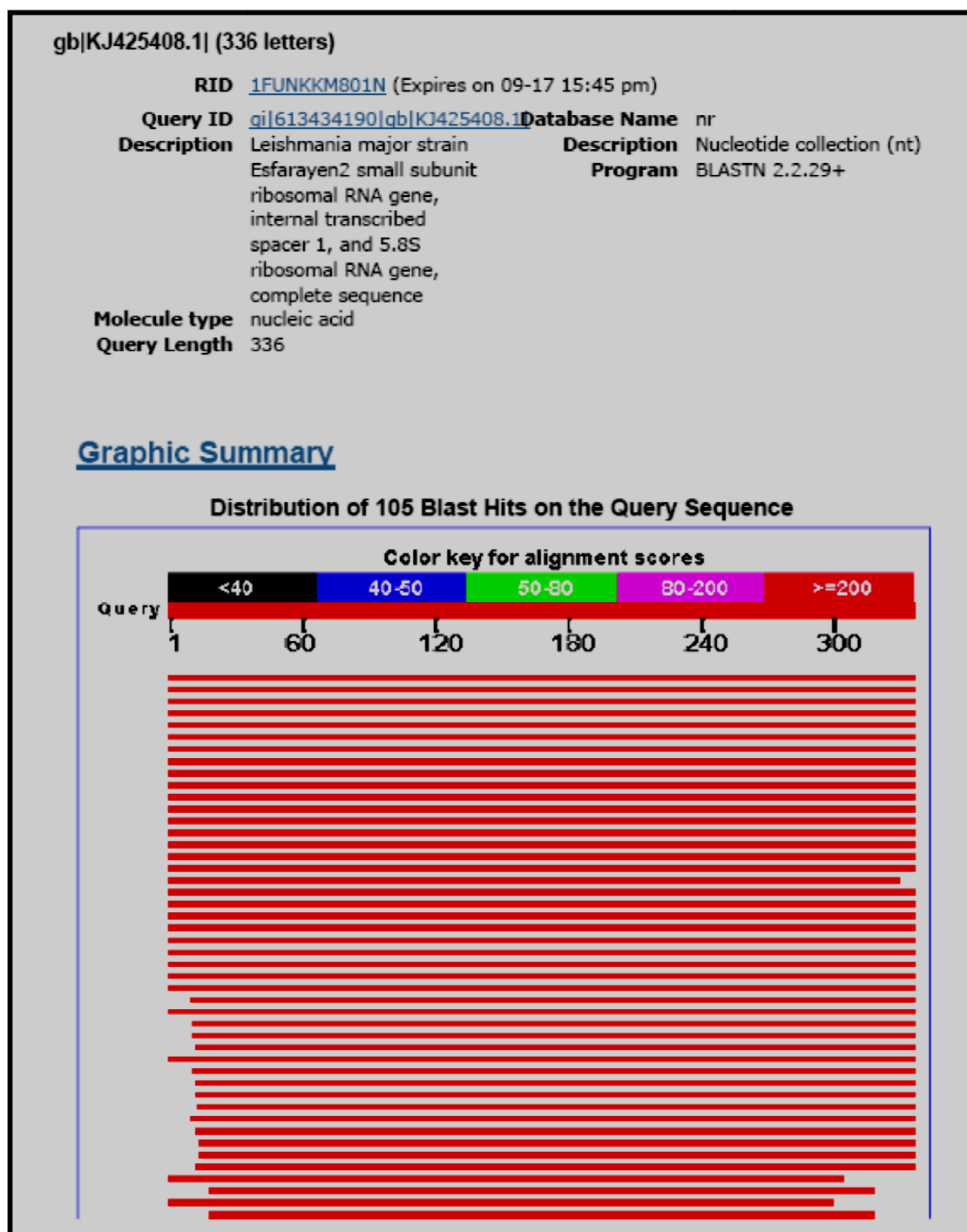
شکل ۳-۳: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ناحیه ITS1 برای تشخیص گونه های لیشمانیا با استفاده از آنزیم HaeIII. L. سایز مارکر، نمونه P کنترل مثبت *L.major* (MHOM/IR/75/ER)، نمونه N کنترل منفی، نمونه های A,B,C انگل *L.major* در پشه خاکی های *P.papatasi* آلوده به انگل *L.major*،، نمونه D انگل *L.major* در پشه خاکی *P.salehi* آلوده به انگل *L.major*

سکانس های ناحیه ITS1 DNA نمونه های آلوده پشه خاکی *P.papatasi* و *P.salehi* به انگل لیشمانیا مازور در پایگاه داده ای بانک ژن (GenBank database) با شماره های KJ425408, KJ425407,

KM056403 ثبت شدند. همچنین نمونه آلوده پشه خاکی گونه به انگل لیشمانیا تورانیکا با شماره
KJ425406 ثبت شد. سه ژن اول ثبت شده با ژن های AY573187, KC505421, KJ194178 (ایران)،
FN677357 (ازبکستان)، مشابهت ۱۰۰ درصدی داشت در حالی که با ژن ثبت شده به شماره F339752 مربوط
به انگل *L. mexicana venezuelensis* از کشور مکزیک مشابهت ۹۹ درصدی داشت.

۳-۲-۴: نتیجه BLAST انگل *L. major* جدا شده از پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی

شکل ۳-۴ نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از پشه خاکی *P. papatasi*
را در روستاهای شهرستان اسفراین نشان می دهد. این نتیجه نشان داد که انگل جدا شده از پشه خاکی های مناطق
تحت بررسی همان انگل *L. major* است و آلوده بودن این پشه خاکی ها به انگل مذکور تأیید گردید.



شکل ۳-۴: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از *P. papatasi* و میزان مشابهت آن با نمونه های موجود در GenBank

در شکل های ۳-۵ و ۳-۶ نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L.major* جدا شده از *P.papatasi* و میزان مشابهت آن با نمونه های موجود در GenBank نشان داده شده است. این شکل ها نشان می دهند که نمونه های پشه خاکی *P.papatasi* آلوده به انگل *L.major* با ۵ نمونه ثبت شده انگل لیشرمانیا مازوردر ایران و جهان مشابهت ۱۰۰ درصدی دارند

CBI Blast:gb|KJ425408.1| (336 letters)

nd: Previous Next Options

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 27
Sequence ID: [emb|FR796423.1](#) Length: 1130424 Number of Matches: 6

Query	1	CTGGATCATTITCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACTCGGGGAGGCTTATTC	60
Sbjct	991832	CTGGATCATTITCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACTCGGGGAGGCTTATTC	991891
Query	61	tatatatatataGTATAGGCTTTTCCACATACACAGCAAACCTTTTATACTCAAAATTTG	120
Sbjct	991892	TATATATATATAGTATAGGCTTTTCCACATACACAGCAAACCTTTTATACTCGAAATTTG	991951
Query	121	CAGTAAAAAGGCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAAATGT	180
Sbjct	991952	CAGTAAAAAGGCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAAATGT	992011
Query	181	CCGTTTATACaaaaaaaTAGACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGAGGGAGAGAGAGGGGGG	240
Sbjct	992012	CCGTTTATACAAAAAATAGACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGAGGGAGAGAGAGGGGGG	992071
Query	241	TGCGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATT	300
Sbjct	992072	TGCGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATT	992131
Query	301	TCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCAGATAAGTGGTAT	336
Sbjct	992132	TCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCAGATAAGTGGTAT	992167

شکل شماره ۳-۵: Blast توالی *L.major* سکانس شده از *P.papatasi* با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن

همانطور که ملاحظه می شود، انگل با نمونه ی FR796423 که در بانک جهانی ژن ثبت گردیده است، ۱۰۰ درصد مشابهت دارد.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Leishmania major strain Esfaraven2 small subunit ribosomal RNA gene, inter	621	621	100%	2e-174	100%	KJ425408.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leishmania major strain Esfaraven1 small subunit ribosomal RNA gene, inter	621	621	100%	2e-174	100%	KJ425407.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leishmania major isolate IRN186 internal transcribed spacer 1, partial sequer	621	621	100%	2e-174	100%	KJ194178.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leishmania major 18S rRNA gene (partial), ITS1 and 5.8S rRNA gene (partial),	621	621	100%	2e-174	100%	FN677357.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leishmania major strain MHOM/ir/00/PII22 small subunit ribosomal RNA gene	621	621	100%	2e-174	100%	AY573188.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leishmania major strain MHOM/IR/00/PII2 small subunit ribosomal RNA gene,	621	621	100%	2e-174	100%	AY573187.1

شکل ۳-۶: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از *P. papatasi* و میزان مشابهت

آن با نمونه های موجود در GenBank

در شکل ۳-۷ نتیجه بلاست انگل *Leishmania turanica* جدا شده از یکی از نمونه های پشه خاکی جنس

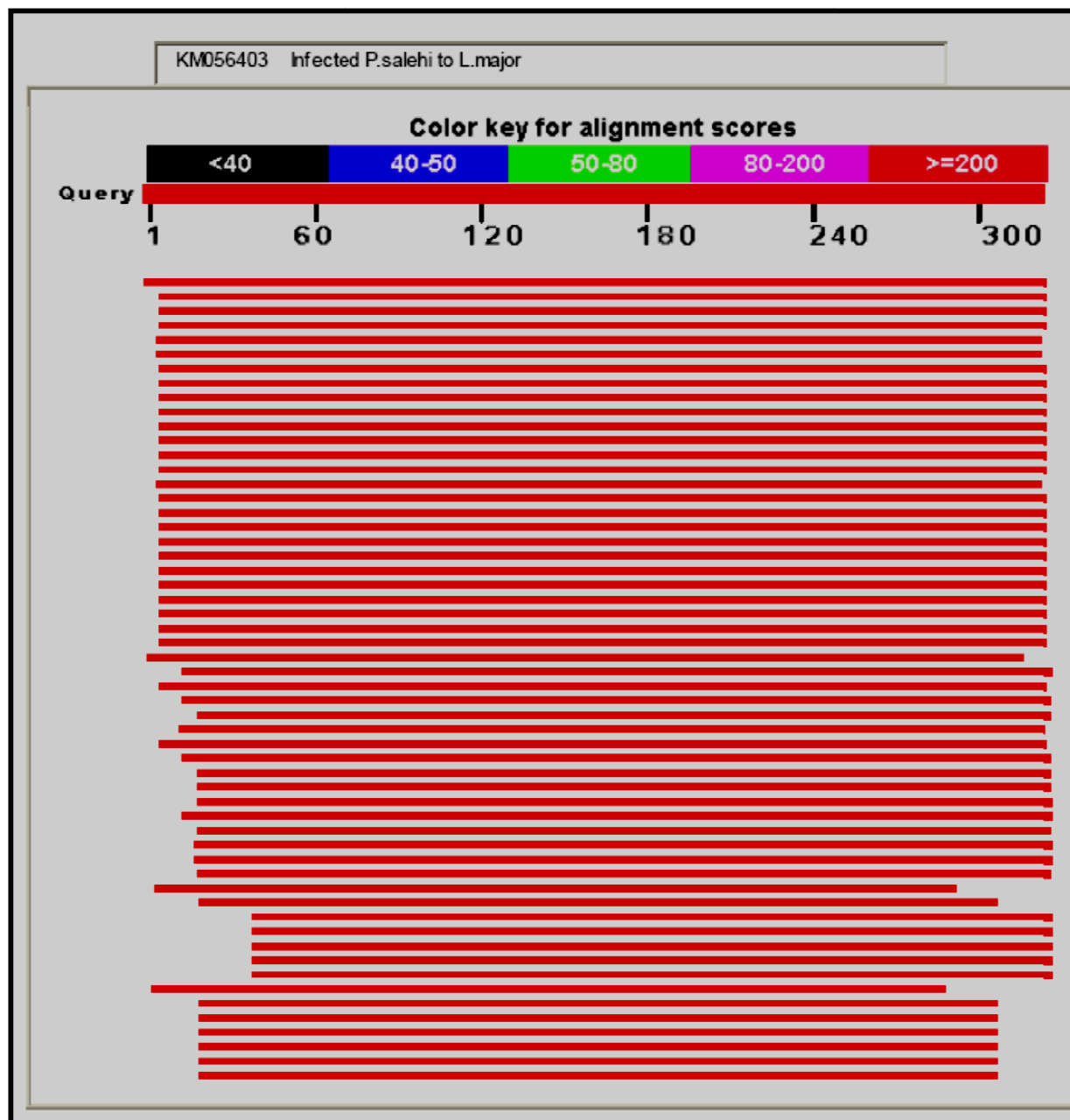
P. papatasi و میزان مشابهت ۱۰۰ درصدی آن با یکی از ژن های ثبت شده در جهان نمایش داده شده است.

Download ▾ GenBank Graphics					▼ Next ▲ Pre
Leishmania turanica DNA for internal transcribed spacer, strain MRHO/MN/83/MNR1					
Sequence ID: emb AJ000308.1 Length: 1048 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 334 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
594 bits(658)	2e-166	332/334(99%)	0/334(0%)	Plus/Plus	
Query 2	CTGGATCATTTTCCGATGATTACCCAAAAACATATACAACTCGGGGCGGCC	tattat	61		
Sbjct 1	CTGGATCATTTTCCGATGATTACCCAAAAACATATACAACTCGGGGCGGCC	TATTAT	60		
Query 62	atatatatattataGGCCTTCCACATACACAGCAAAC	TTTATACTCGAAATTTGCAG	121		
Sbjct 61	ATATATATATTATAGGCCTTCCACATACACAGCAAAC	TTTATACTCGAAATTTGCAG	120		
Query 122	TaaaaaaaGGCCGATCGACGTTATAGAACGCACACACCGCCTATACACAAAAGCAAAA		181		
Sbjct 121	TAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAGAACGCACACACCGCCTATACACAAAAGCAAAA		180		
Query 182	ATGTCCGTGTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGGGTGTGGGGTGCG		241		
Sbjct 181	ATGTCCGTGTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGGGTGTGGGGTGCG		240		
Query 242	CGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTC		301		
Sbjct 241	CGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTC		300		
Query 302	GTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAAGTGGTAT		335		
Sbjct 301	CTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAAGTGGTAT		334		

شکل ۳-۷: نتیجه Blast نمونه *L. turanica* در *P. papatasi* با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن.

همانطور که ملاحظه می شود، این نمونه با نمونه ی AJ000308 که در بانک جهانی ژن ثبت گردیده است، ۱۰۰ درصد مشابهت دارد.

در اشکال ۳-۸ تا ۳-۱۰ بلاست پشه خاکی گونه *P.salehi* آلوده به انگل *L.major* ثبت شده است. انگل فوق با ۵ ژن ثبت شده در بانک جهانی ژن مشابهت ۱۰۰ درصد داشت.



شکل ۳-۸: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L.major* جدا شده از *P.salehi* و میزان مشابهت آن با نمونه های موجود در GenBank

Sequences producing significant alignments:							
Select: All None Selected:0							
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Leishmania major isolate IRN186 internal transcribed spacer 1, partial sequer	625	625	100%	1e-175	100%	KJ194178.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania major 18S rRNA gene (partial), ITS1 and 5.8S rRNA gene (partial)	625	625	100%	1e-175	100%	FN677357.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania major strain MHOM/IR/00/PII22 small subunit ribosomal RNA gene	625	625	100%	1e-175	100%	AY573188.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania major strain MHOM/IR/00/PII2 small subunit ribosomal RNA gene	625	625	100%	1e-175	100%	AY573107.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania major strain Esfaraven2 small subunit ribosomal RNA gene, inter	621	621	99%	2e-174	100%	KJ425408.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania major strain Esfaraven1 small subunit ribosomal RNA gene, inter	621	621	99%	2e-174	100%	KJ425407.1

شکل ۳-۹: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از *P. salehi* و میزان مشابهت

آن با نمونه های موجود در GenBank

Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 27					
Sequence ID: emb FR796423.1 Length: 1130424 Number of Matches: 6					
Range 1: 991832 to 992169 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
619 bits(335)	5e-174	337/338(99%)	0/338(0%)	Plus/Plus	
Query 1	CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTC				60
Sbjct 991832	CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTC				991891
Query 61	tatatatatataGTATAGGCTTTTCCACATACACAGCAAACCTTTTATACTCAAAATTTG				120
Sbjct 991892	TATATATATATAGTATAGGCTTTTCCACATACACAGCAAACCTTTTATACTCGAAATTTG				991951
Query 121	CAGTAAAAAAGGCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAATGT				180
Sbjct 991952	CAGTAAAAAAGGCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAATGT				992011
Query 181	CCGTTTATACaaaaaaaTAGACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGAGGGAGAGAGAGGGGGG				240
Sbjct 992012	CCGTTTATACAAAAAATAGACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGAGGGAGAGAGAGGGGGG				992071
Query 241	TGCGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT				300
Sbjct 992072	TGCGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT				992131
Query 301	TCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCGATAAGTGGTATCA			338	
Sbjct 992132	TCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCGATAAGTGGTATCA			992169	

شکل ۳-۱۰: نتیجه Blast نمونه *L. major* در پشه خاکی *P. salehi* با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن.

همانطور که ملاحظه می شود، انگل با نمونه ی FR796423 که در بانک جهانی ژن ثبت گردیده است، ۱۰۰ درصد مشابهت شت.

۳-۳: بررسی مخازن بیماری از نظر آلودگی به انگل لیشمانیا

۳-۳-۱: جوندگان صید شده

در این مطالعه تعداد ۴۴ سر جونده صحرایی صید گردید که متعلق به ۲ گونه زیر بودند:

۳-۳-۱-۱: *Rhombomys opymus* (جریل بزرگ): این جونده از همه مناطق تحت مطالعه صید گردید.

۷۶/۲٪ جوندگان صید شده در مناطق تحت بررسی مربوط به این گونه بودند. بیشترین فراوانی صید این گونه با

۳۷/۵٪ مربوط به روستای حسین آباد و کمترین موارد صید این گونه مربوط به روستای اسماعیل آباد با ۳/۲۳٪ بود

(جدول ۳-۲).

۳-۳-۱-۲: *Meriones libycus* (میریونس لیبیکوس)

این جونده از روستاهای حسین آباد و کلاته شور صید گردید. ۲۳/۸٪ جوندگان صید شده در مناطق تحت بررسی

مربوط به این گونه بودند. بیشترین فراوانی صید این گونه با ۷۵٪ مربوط به روستای حسین آباد و کمترین موارد صید

این گونه مربوط به روستای کلاته شور با ۲۵٪ بود (جدول ۳-۲).

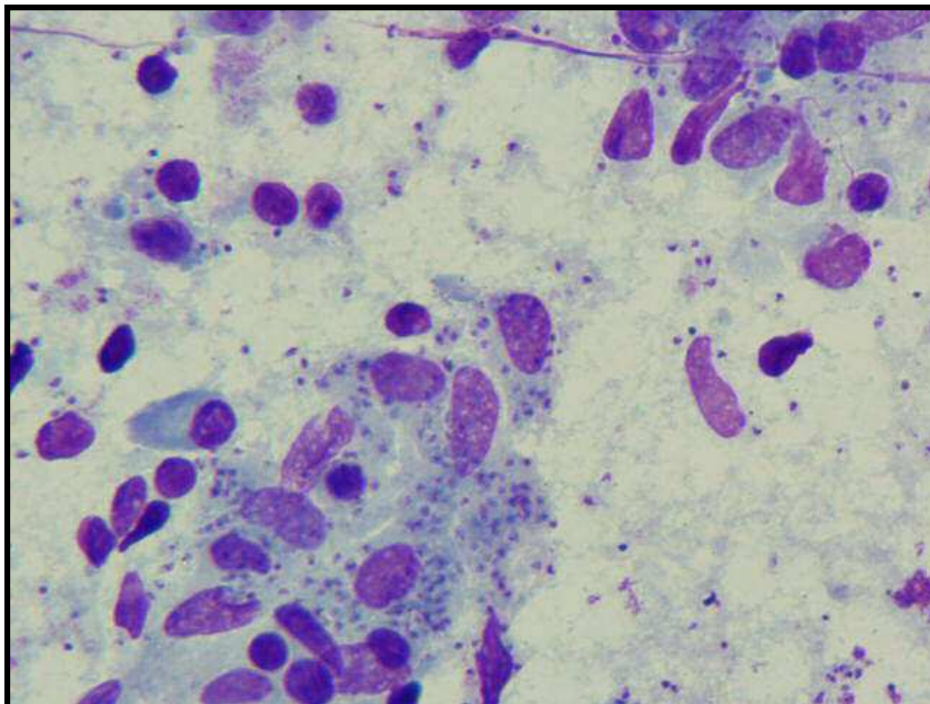
جدول ۲-۳: فراوانی و ترکیب نسبی گونه ای جوندگان صحرایی صید شده از روستاهای تحت مطالعه شهرستان اسفراین استان خراسان شمالی، سال ۹۳-۱۳۹۲

گونه جونده محل صید		<i>Rhombomys opimus</i>		<i>Meriones libycus</i>		جمع کل	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱۲	۳۷/۵	۹	۷۵	۲۱	۴۷/۸		
۱۰	۳۱/۲۵	۳	۲۵	۱۳	۲۹/۵		
۶	۱۸/۷۵	۰	۰	۶	۱۳/۶		
۴	۱۲/۵	۰	۰	۴	۹/۱		
۳۲	۱۰۰	۱۲	۱۰۰	۴۴	۱۰۰		

۳-۳-۲: بررسی آلودگی جوندگان صید شده به انگل لیشمانیوز

۳-۳-۲-۱: مشاهدات میکروسکوپی

از بین ۴۴ لام تهیه شده از جوندگان صید شده، ۳۲ عدد لام (۷۲/۷۲٪) مثبت تشخیص داده شدند. وجود آلودگی به آماستیگوت در یکی از جوندگان مورد بررسی در شکل ۳-۱۱ نشان داده شده است. در این تصویر آلوده بودن جوندگان به انگل لیشمانیا ماژور با توجه به مشاهده kinetoplast در درون هسته محرز و آشکار بود. در این بررسی کلیه نمونه های مربوط به جونده *Rhombomys opimus* (۱۰۰٪) نسبت به فرم های آماستیگوت انگل لیشمانیا مثبت بودند. در نمونه های جونده *Meriones libycus* موردی از آلودگی نسبت به فرم های آماستیگوت انگل لیشمانیا بصورت میکروسکوپی مشاهده نشد.



شکل ۳-۱۱: فرم آماستیگوت انگل لیشمانیا در لام تهیه شده از رومبومیس اپیموس صید شده، شهرستان اسفراین،

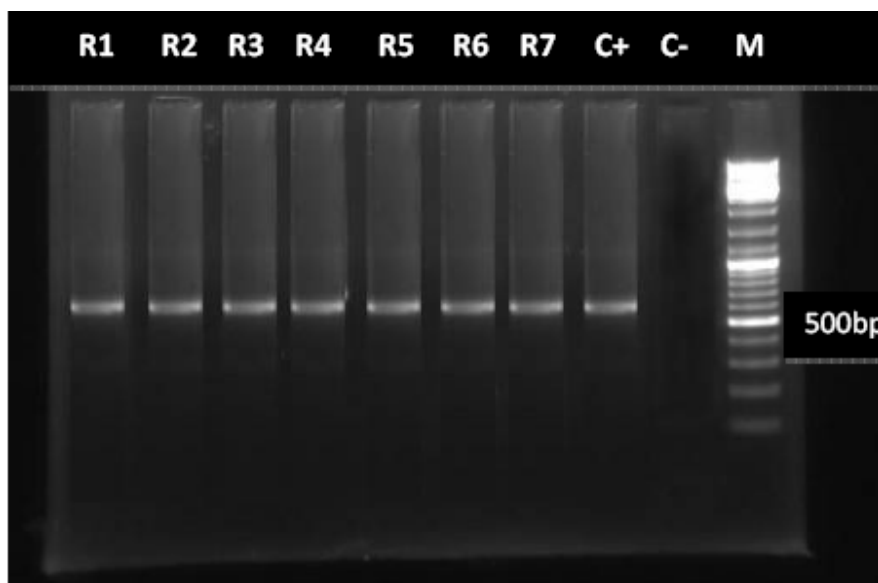
سال ۱۳۹۲

۳-۲-۲: تشخیص اولیه آلودگی به انگل لیشمانیا در مخازن عامل بیماری

به منظور تأیید آلودگی و تفکیک نوع انگل، بررسی های مولکولی با روش حساس kDNA nested PCR

انجام گردید. نتایج بررسی ها نشان داد که کلیه لام های میکروسکوپی مثبت، انگل *L. major* بودند و باندی به

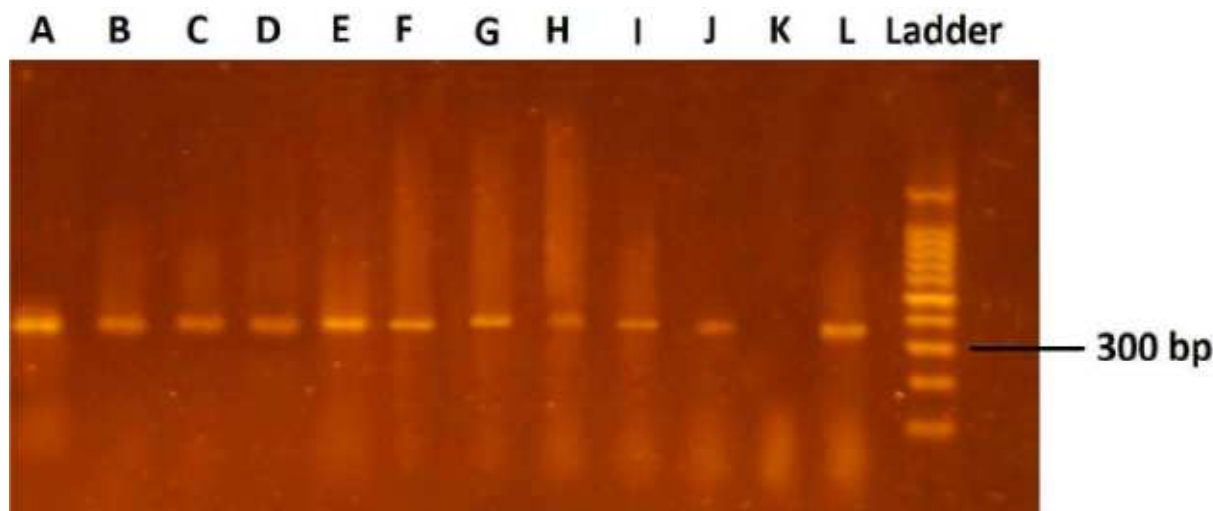
طول ۵۶۰ bp روی ژل آگاروز تشکیل دادند و موید مشاهدات میکروسکوپی بودند (شکل ۳-۱۲).



شکل ۳-۱۲: نتایج حاصل از PCR مربوط به لوکوس kDNA نمونه های آلوده به انگل لیشمانیا ماژور در ژل یک درصد. لاین C+ مربوط به کنترل مثبت *L.major* (MHOM/IR/75/ER). لاین C- کنترل منفی. لاین R1- R7 مربوط به نمونه لام های آلوده جوندگان، M بیانگر Ladder ۱۰۰ جفت باز مربوط به شرکت Fermentas.

۳-۲-۳-۳: تعیین هویت اولیه انگل های لیشمانیا در مخازن عامل بیماری

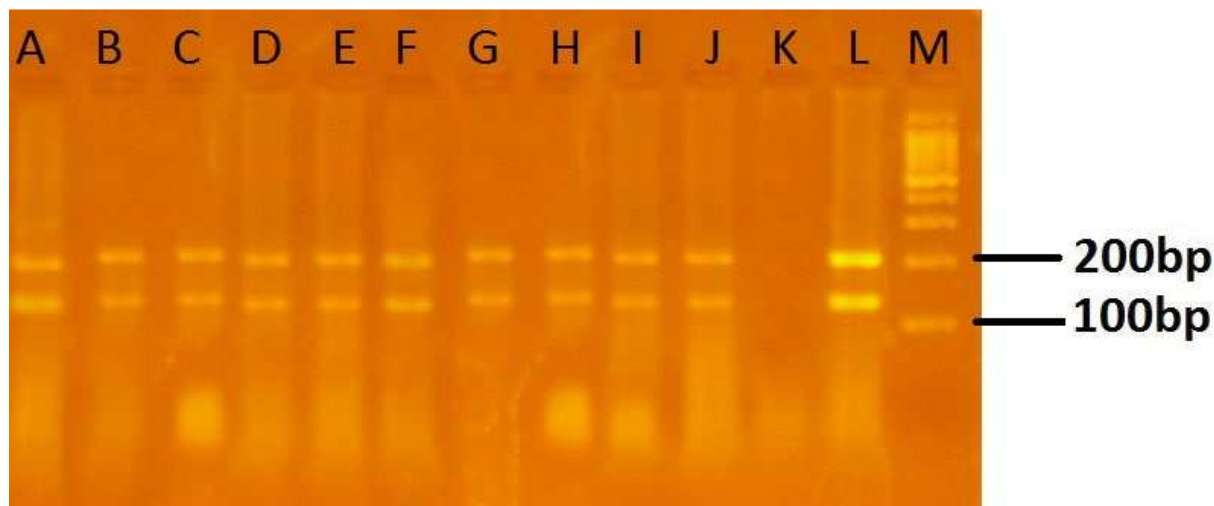
به لحاظ متغیر بودن ماهیت ژنتیکی Minicircle و تفاوت هایی که حتی در حلقه های یک انگل لیشمانیا وجود دارد، تعیین توالی این بخش از ژنوم انگل سخت یا امکان پذیر نمی باشد. بنابراین برای تعیین هویت انگل به تکثیر بخش Internal Transcribed Spacer (ITS) ژن ITS1-rDNA اقدام شد. به این منظور بعد از set کردن واکنش با انگل های کنترل مثبت، ۳۲ نمونه مثبت شده (*Rhombomys opimus*) و ۱۲ نمونه منفی (*Meriones libycus*) از طریق مولکول Minicircle نیز با این بخش بررسی شدند. از ۳۲ نمونه مثبت مورد بررسی همگی با بخش ITS1 مثبت گردید. در تکثیر این ژن از پرایمرهای عمومی ITS1 که تمامی گونه های جنس لیشمانیا را آمپلی فای می کند استفاده گردید. این پرایمرها محصول PCR به طول ۳۵۰ bp ایجاد کردند. در تصویر شماره ۳-۱۳) الکتروفورز محصول PCR این ژن نشان داده شده است.



شکل ۳-۱۳: نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن ITS1 نمونه های انسانی، جونده و پشه خاکی های آلوده به انگل لیثمانیا در ژل یک و نیم درصد. نمونه های A-C مربوط به پشه خاکی های آلوده، نمونه های D-G مربوط به لام های آلوده جوندگان و نمونه های H-I مربوط به نمونه های آلوده لام های انسانی، نمونه K کنترل منفی، نمونه L کنترل مثبت *L.major* (MHOM/IR/75/ER) و Ladder نیز مربوط به شرکت Fermentas ۱۰۰ جفت باز)

۳-۲-۴: نتایج انجام واکنش (RFLP) با آنزیم HaeIII برای نمونه های مثبت جونده

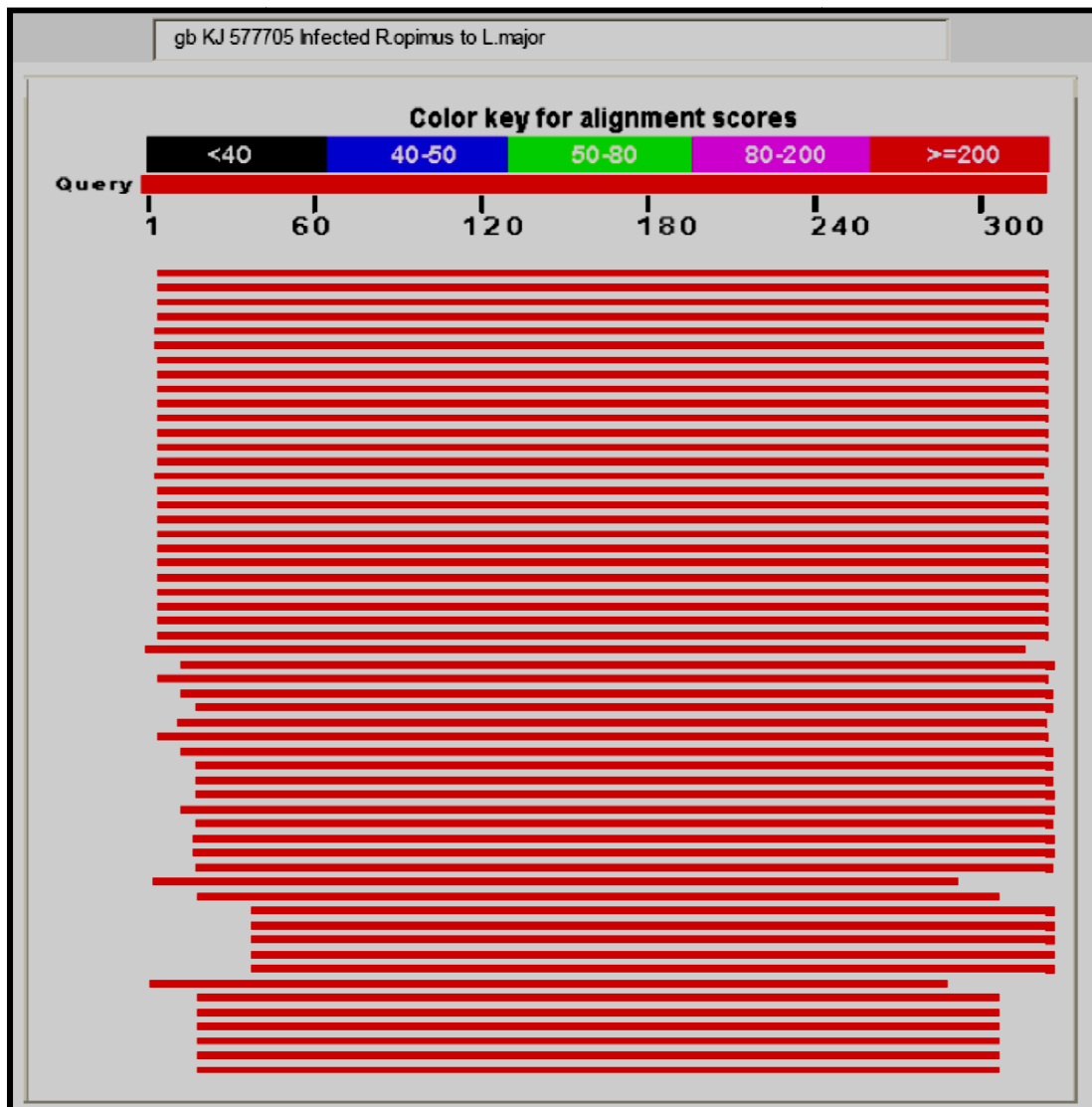
برای تأیید نهایی انگل، الکتروفورز محصول PCR-RFLP ناحیه ITS1 برای تشخیص گونه های لیثمانیا با استفاده از آنزیم HaeIII انجام گردید و باندهایی با قطعات ۲۲۰ bp و ۱۴۰ bp بر روی ژل ۲/۵ در صد الکتروفورز تشکیل گردید که تأیید کننده وجود انگل *L.major* در نمونه های آلوده *Rhombomys opimus* بود (شکل ۳-۱۴).



شکل ۳-۱۴: نتایج حاصل از RFLP مربوط به تعدادی از محصولات PCR نمونه های آلوده به انگل پشه خاکی، لام های جوندگان و نیز لام های انسانی در ژل دو درصد. نمونه های A-C مربوط به پشه خاکی های آلوده، نمونه های D-G مربوط به لام های آلوده جوندگان (*Rhombomys opimus*) و نمونه های H-J مربوط به نمونه های آلوده لام های انسانی می باشد. نمونه K کنترل منفی، نمونه L کنترل مثبت (MHOM/IR/75/ER) *L. major* نمونه M: Ladder مربوط به شرکت Fermentas، ۱۰۰ جفت باز)

۳-۲-۵: نتیجه BLAST انگل *L. major* جدا شده از جونده مثبت رومبومیس اپیموس

شکل ۳-۱۵: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از جونده *R. opimus* را در روستاهای شهرستان اسفراین نشان می دهد. همانطوریکه ملاحظه می شود، انگل جدا شده از جوندگان مناطق تحت بررسی همان انگل *L. major* بوده و آلوده بودن این جوندگان را به انگل مذکور تأیید گردید.



شکل ۳-۱۵: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *Lmajor* جدا شده از جونده *R.opimus* و

میزان مشابهت آن با نمونه های موجود در GenBank

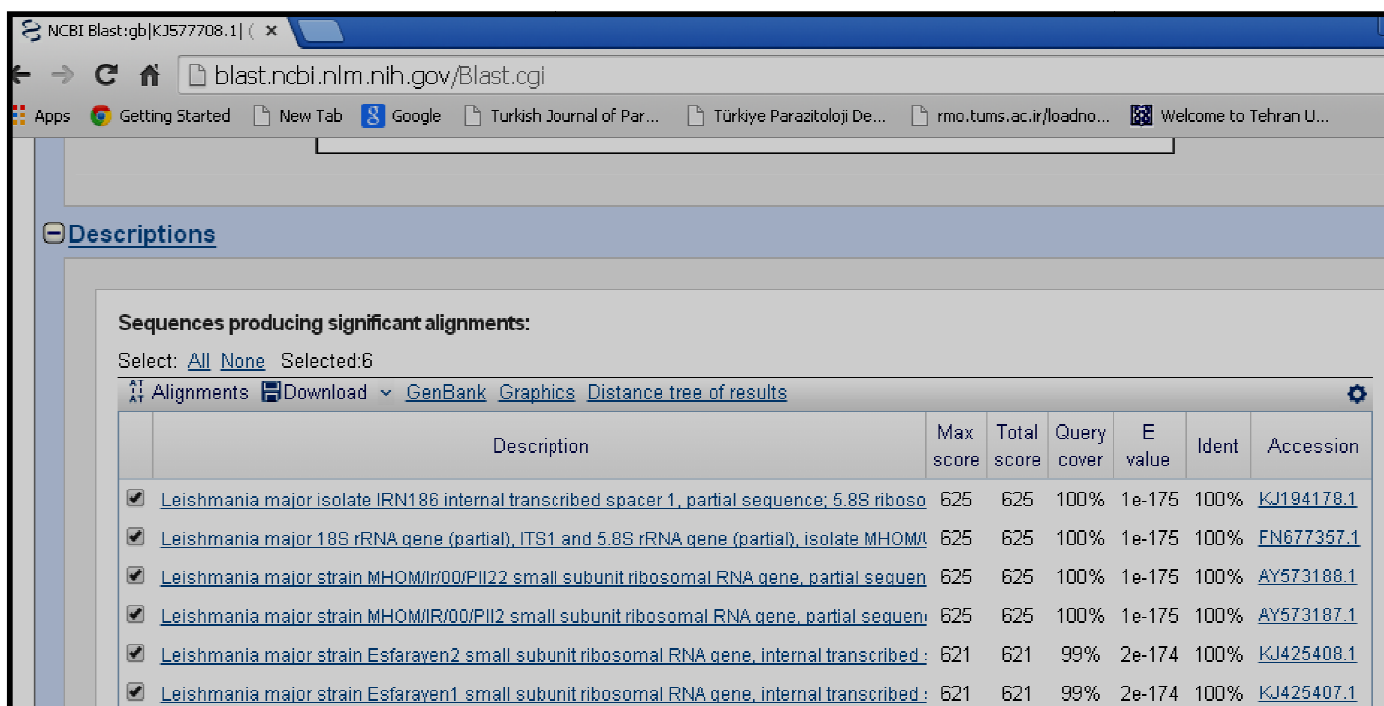
تعیین آلودگی در لام های جوندگان صید شده در بخش انگل شناسی به انجام رسید و براساس نتایج بدست آمده، تعدادی از لام ها دارای انگل های دراز و کشیده و تعدادی نیز دارای انگل های گرد بودند. به همین دلیل برای بررسی تفاوت های ژنتیکی این انگل ها نیاز بود که تعدادی از نمونه ها از طریق تکاپوزیست برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردند. شش نمونه برای تعیین ارسال گردید که در نهایت با نام های

KJ577703, KJ577704, KJ577705, KJ577706, KJ577707 و KJ577708 در بانک جهانی ژن

به ثبت رسیدند. تمامی این شش نمونه از لحاظ توالی کاملاً باهم مشابه بودند و با نمونه های انگل یافته شده از پشه

خاکی های آلوده به انگل *L. major* نیز ۱۰۰٪ تشابه داشتند (شکل ۳-۱۶ و ۳-۱۷). به همین دلیل بر خلاف تفاوت

های مورفولوژیکی این انگل ها، ژنوتیپ آنها از لحاظ لوکوس های ITS1 کاملاً مشابه بود.



NCBI Blast:gb|KJ577708.1| (x)

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Apps Getting Started New Tab Google Turkish Journal of Par... Türkiye Parazitoloji De... rmo.tums.ac.ir/loadno... Welcome to Tehran U...

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:6

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major isolate IRN186 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S riboso	625	625	100%	1e-175	100%	KJ194178.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major 18S rRNA gene (partial), ITS1 and 5.8S rRNA gene (partial), isolate MHOM/I	625	625	100%	1e-175	100%	FN677357.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major strain MHOM/Ir/00/PII22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen	625	625	100%	1e-175	100%	AY573188.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major strain MHOM/Ir/00/PII2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen	625	625	100%	1e-175	100%	AY573187.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major strain Esfaryen2 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed:	621	621	99%	2e-174	100%	KJ425408.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major strain Esfaryen1 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed:	621	621	99%	2e-174	100%	KJ425407.1

شکل ۳-۱۶: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از *P. salehi* و میزان مشابهت

آن با نمونه های موجود در GenBank

در شکل ۳-۱۶ می توان مشابهت ۱۰۰ در صدی انگل لیشمانیا ماژوز سکانس شده از رومبومیس اپیموس را با شماره دسترسی KJ577708 با شش نمونه دیگر ثبت شده در بانک جهانی مشاهده کرد. علاوه بر آن انگل سکانس شده با نمونه های دیگر شامل EF413075 (ایران-پشه خاکی) ، KJ194178 (ایران- جونده مریونس لیبیکوس)، JN860713 (ایران-انسان) و همچنین AJ300481 از کشور سودان مشابهت ۱۰۰ در صدی داشت.

Leishmania major internal transcribed spacer 1,(ITS1) 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer 2(MHOM/SD/90/SUDAN3)

Sequence ID: [emb|AJ300481.1](#) Length: 1108 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 327 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
604 bits(327)	2e-169	327/327(100%)	0/327(0%)	Plus/Plus
Query 12	TCCGATGATTACACCCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTatatatatatat	71		
Sbjct 1	TCCGATGATTACACCCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTATATATATATAT	60		
Query 72	aGTATAGGCCTTTTCCCACATACACAGCAAACTTTTATACTCAAAAATTTGCAGTAAAAAAG	131		
Sbjct 61	AGTATAGGCCTTTTCCCACATACACAGCAAACTTTTATACTCAAAAATTTGCAGTAAAAAAG	120		
Query 132	GCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACa	191		
Sbjct 121	GCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACA	180		
Query 192	aaaaaaTAGACGGCGTTTTTCGGTTTTTGCGGGAGGGAGAGAGAGGGGGGTGCCGTGCCGCT	251		
Sbjct 181	AAAAAATAGACGGCGTTTTTCGGTTTTTGCGGGAGGGAGAGAGAGGGGGGTGCCGTGCCGCT	240		
Query 252	GGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	311		
Sbjct 241	GGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	300		
Query 312	CGCAGTAAAGTGCGATAAGTGGTATCA	338		
Sbjct 301	CGCAGTAAAGTGCGATAAGTGGTATCA	327		

شکل ۳-۱۷: نتیجه Blast نمونه *Lmajor* در جونده *R.opimus* با یکی از نمونه های بانک جهانی ژن در کشور سودان .

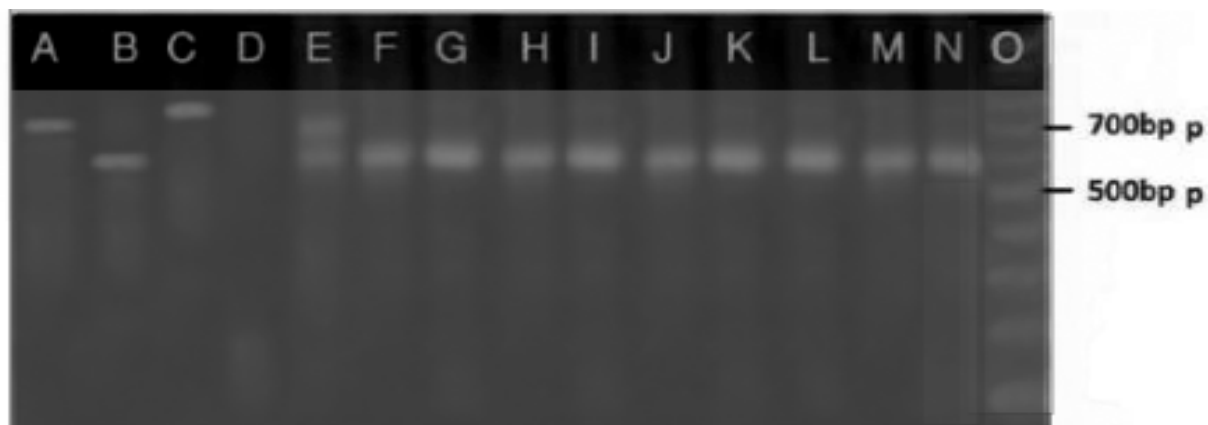
همانطور که ملاحظه می شود، انگل با نمونه ی AJ300481 از کشور سودان که در بانک جهانی ژن ثبت گردیده است، ۱۰۰ درصد مشابهت داشت.

۳-۴: بررسی نمونه های انسانی از نظر آلودگی به انگل لیشمانیا

همزمان با خونگیری از موارد مثبت انسانی به انگل لیشمانیا، نمونه گیری از زخم تازه ۴۰ بیمار و تعیین آلودگی آنها به انگل لیشمانیا به روش مولکولی بر حسب ژن های هدف ITS1 و kDNA به انجام رسید. از کناره های زخم های تازه و فعال با استفاده از واکسینواستیل یا تیغه اسکالپل نمونه برداری می شد. از هر نمونه لام مستقیم تهیه و پس از رنگ آمیزی با گیمسا با درشتنمایی $\times 1000$ میکروسکوپ نوری از نظر اجسام لیشمن مورد بررسی قرار گرفت. لام های مثبت از نظر انگل لیشمانیا به روش های ITS1 PCR- RFLP و kDNA NESTED - PCR تعیین هویت گردیدند. (شکل ۳-۱۷ و ۳-۱۸). برای تایید این تشخیص های مرفولوژیک به روش ملکولی تمامی نمونه های لام های آلوده، مورد PCR قرار گرفت که تمامی نمونه ها *L. major* تشخیص داده شدند. سه عدد از این نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید که بعد از تعیین توالی در بانک جهانی ژن به ثبت رسیدند. یکی از نمونه های ثبت شده با شماره KM052753 در بانک جهانی ژن قابل دسترس است.

۳-۴-۱: تشخیص اولیه آلودگی به انگل لیشمانیا در نمونه های بیمار و همسانی آن با نمونه های مخزن و ناقل

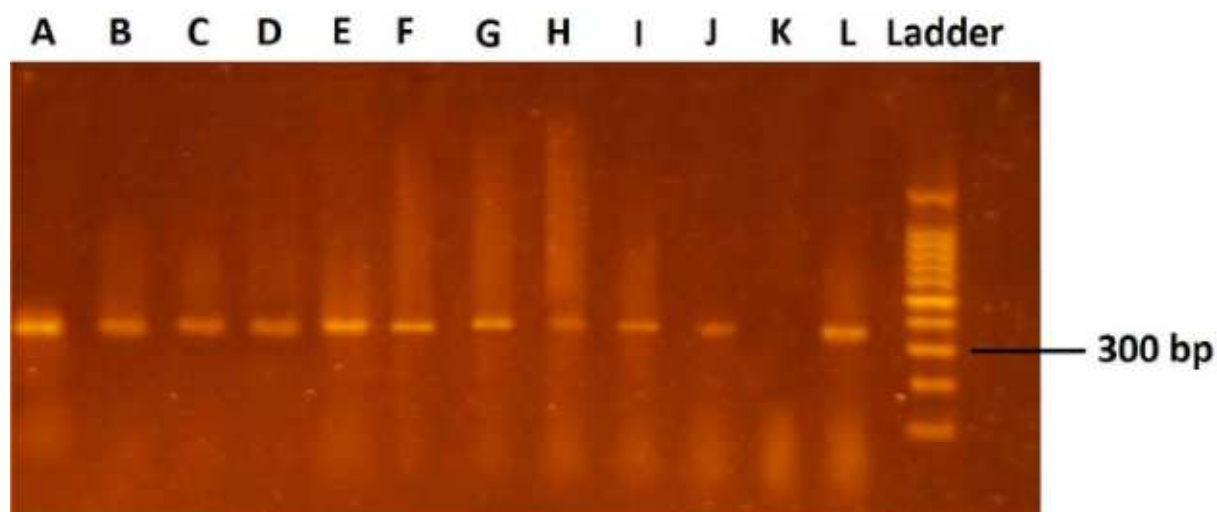
به منظور تأیید آلودگی و تفکیک نوع انگل، بررسی های مولکولی با روش حساس kDNA nested PCR انجام گردید. نتایج بررسی ها نشان داد که کلیه لام های میکروسکوپی مثبت، انگل *L. major* بودند و باندی به طول ۵۶۰bp روی ژل آگاروز تشکیل دادند (شکل ۳-۱۸).



شکل ۳-۱۸: نتایج حاصل از PCR مربوط به لوکوس kDNA نمونه های آلوده به انگل پشه خاکی، لام های جوندگان و نیز لام های انسانی در ژل یک درصد. لاین A مربوط به کنترل مثبت *L.infantum* (IPER/IR/2007/AS327) cpbE. لاین B مربوط به کنترل مثبت *L.major* (MHOM/IR/75/ER). لاین C مربوط به کنترل مثبت *L.tropica* (MHOM/IR/03/Mash878). لاین D کنترل منفی. لاین E، ف.پاپاتاسی آلوده به انگل های *L.major* و *L.turanica* به صورت میکس. لاین F و G مربوط به نمونه های آلوده ف.پاپاتاسی و ف.صالحی، لاین H-K مربوط به نمونه لام های آلوده رومبومیس اپیموس، لاین L-N مربوط به نمونه لام های آلوده انسانی و O بیانگر ۱۰۰ Ladder جفت باز مربوط به شرکت Fermentas.

۳-۴-۲: تعیین هویت اولیه انگل های لیشمانیا در مخازن عامل بیماری

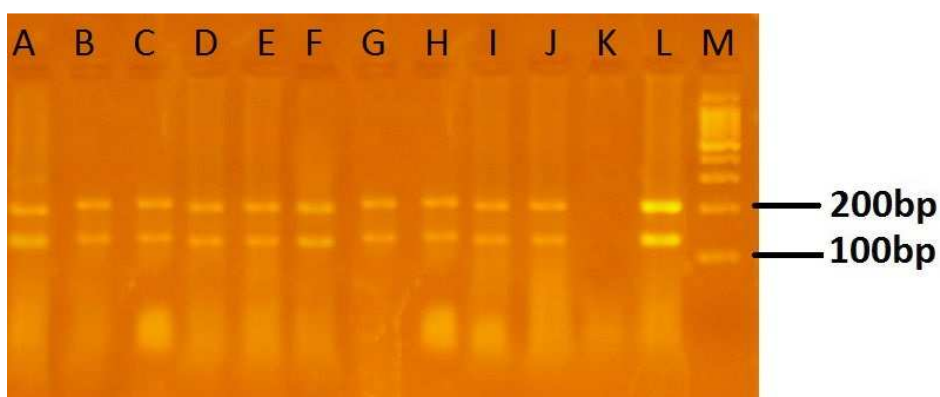
به لحاظ متغیر بودن ماهیت ژنتیکی Minicircle و تفاوت هایی که حتی در حلقه های یک انگل لیشمانیا وجود دارد، تعیین توالی این بخش از ژنوم انگل سخت یا امکان پذیر نمی باشد. بنابراین برای تعیین هویت انگل به تکثیر بخش (ITS) Internal Transcribed Spacer ژن ITS1-rDNA اقدام شد. به این منظور بعد از set کردن واکنش با انگل های کنترل مثبت، ۳ نمونه مثبت شده انسان از طریق مولکول Minicircle نیز با این بخش بررسی شدند. از 3 نمونه مثبت مورد بررسی همگی با بخش ITS1 مثبت گردید. در تکثیر این ژن از پرایمرهای عمومی ITS1 که تمامی گونه های جنس لیشمانیا را آمپلی فای می کند استفاده گردید. این پرایمرها محصول PCR به طول ۳۵۰bp ایجاد کردند. در تصویر شماره ۳-۱۹ الکتروفورز محصول PCR این ژن نشان داده شده است.



شکل ۳-۱۹: نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن ITS1 نمونه های انسانی، جونده و پشه خاکی های آلوده به انگل لیشرمانیا در ژل یک و نیم درصد. نمونه های A-C مربوط به ف.پاپاتاسی و ف.صالحی آلوده، نمونه های D-G مربوط به لام های آلوده رومبومیس اپیموس و نمونه های H-J مربوط به نمونه های آلوده لام های انسانی می باشد. نمونه K کنترل منفی، نمونه L کنترل مثبت *L.major* (MHOM/IR/75/ER) Ladder، ۱۰۰ جفت باز مربوط به شرکت Fermentas)

۳-۴-۳: نتایج انجام واکنش (RFLP) با آنزیم HaeIII برای نمونه های مثبت انسان

برای تأیید نهایی انگل، الکتروفورز محصول PCR-RFLP ناحیه ITS1 برای تشخیص گونه های لیثمانیا با استفاده از آنزیم HaeIII انجام گردید و باندهایی با قطعات ۲۲۰bp و ۱۴۰bp بر روی ژل ۲/۵ در صد الکتروفورز تشکیل گردید که تأیید کننده وجود انگل *L. major* در نمونه های آلوده انسان بود (شکل ۳-۲۰).

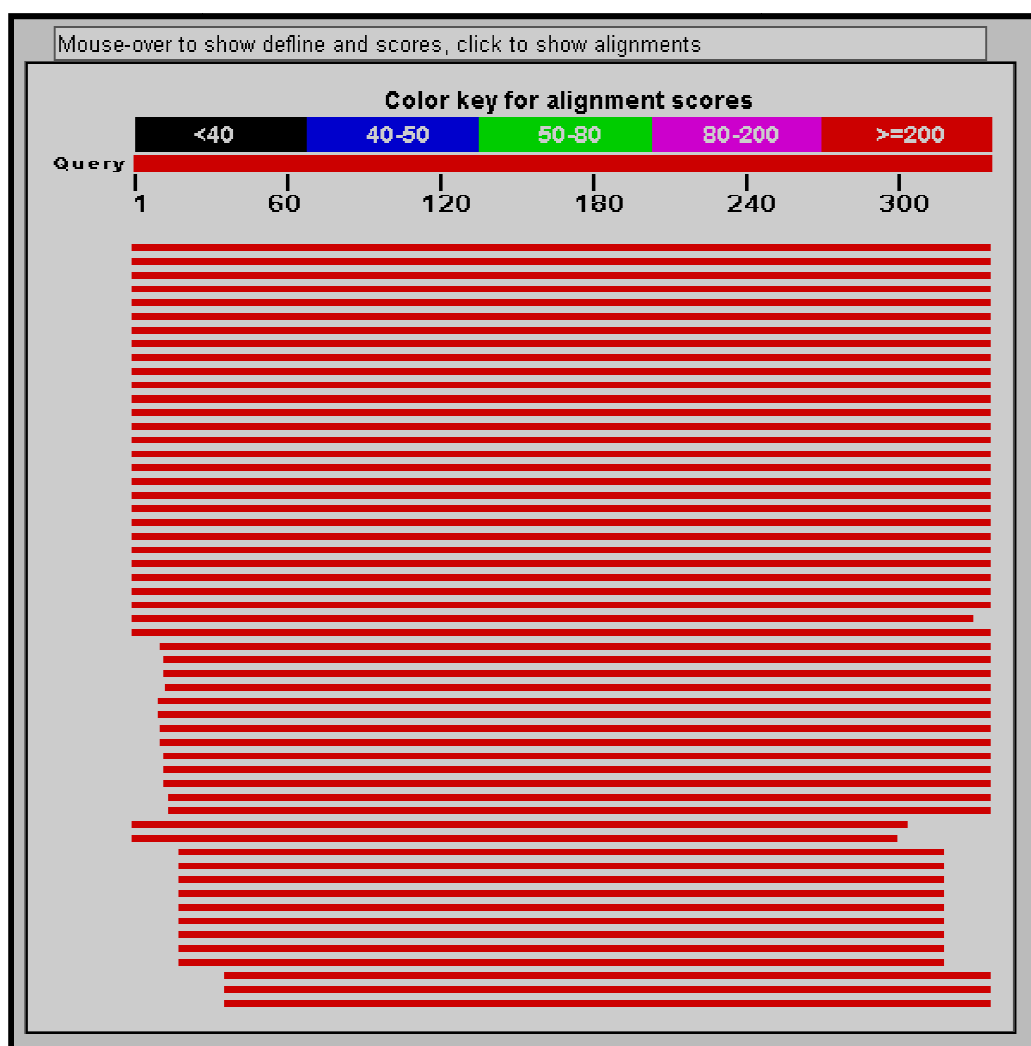


شکل ۳-۲۰: نتایج حاصل از RFLP مربوط به تعدادی از محصولات PCR نمونه های آلوده به انگل پشه خاکی، لام های جوندگان و نیز لام های انسانی در ژل دو درصد. نمونه های A-C مربوط به پشه خاکی های آلوده، نمونه های D-G مربوط به لام های آلوده جوندگان (*Rhombomys opimus*) و نمونه های H-J مربوط به نمونه های آلوده لام های انسانی می باشد. نمونه K کنترل منفی، نمونه L کنترل مثبت *L. major* (MHOM/IR/75/ER)، نمونه M: Ladder مربوط به شرکت Fermentas، ۱۰۰ جفت باز)

۳-۴-۴: نتیجه BLAST انگل *L. major* جدا شده از نمونه مثبت انسان

شکل ۳-۲۱ و ۳-۲۲ نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از انسان را نشان می دهد. این نتیجه نشان داد که انگل جدا شده از انسان در مناطق تحت بررسی همان انگل *L. major* است و آلوده

بودن آن به انگل مذکور تأیید گردید.



شکل ۳-۲۱: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *Lmajor* جدا شده انسان با شماره دسترسی

GenBank KM052753 و میزان مشابهت آن با نمونه های موجود در

Sequences producing significant alignments:							
Select: All None Selected: 7							
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major strain 1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	621	621	100%	2e-174	100%	KM052753.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 27	621	3729	100%	2e-174	100%	FR796423.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major isolate 36 clone 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran	621	621	100%	2e-174	100%	FJ753394.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major isolate 6 clone 6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	621	621	100%	2e-174	100%	FJ753393.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major isolate 6 clone 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	621	621	100%	2e-174	100%	FJ753392.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major isolate 36 clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran	621	621	100%	2e-174	100%	FJ753391.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania major strain MHOM/ir00/PII1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc	621	621	100%	2e-174	100%	AY550178.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania mexicana venezuelensis internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	621	621	100%	2e-174	100%	AF339752.1

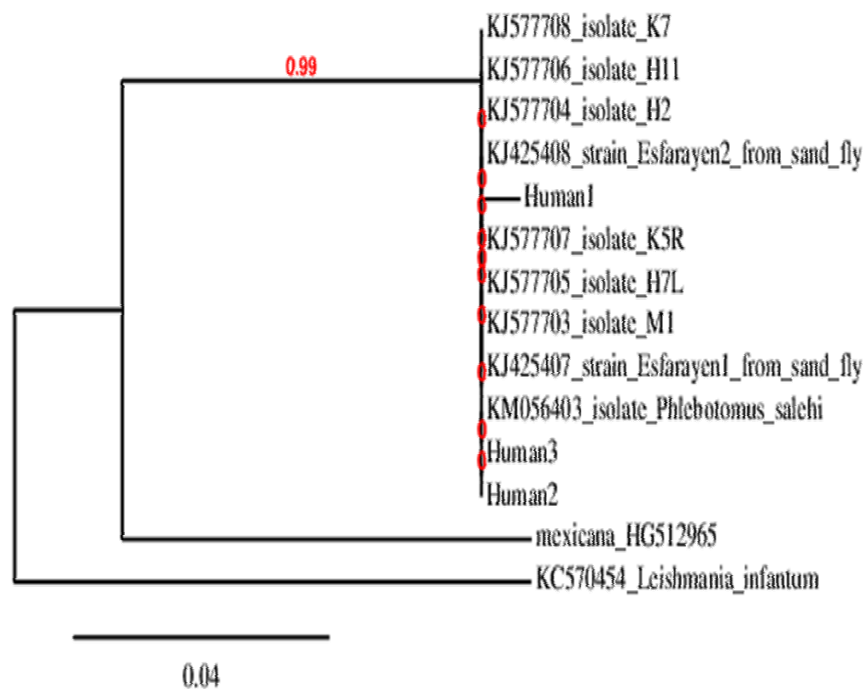
شکل ۳-۲۲: نتیجه BLAST حاصل از توالی قطعه ITS1 انگل *L. major* جدا شده از انسان با شماره دسترسی

KM052753 و میزان مشابهت آن با نمونه های موجود در GenBank

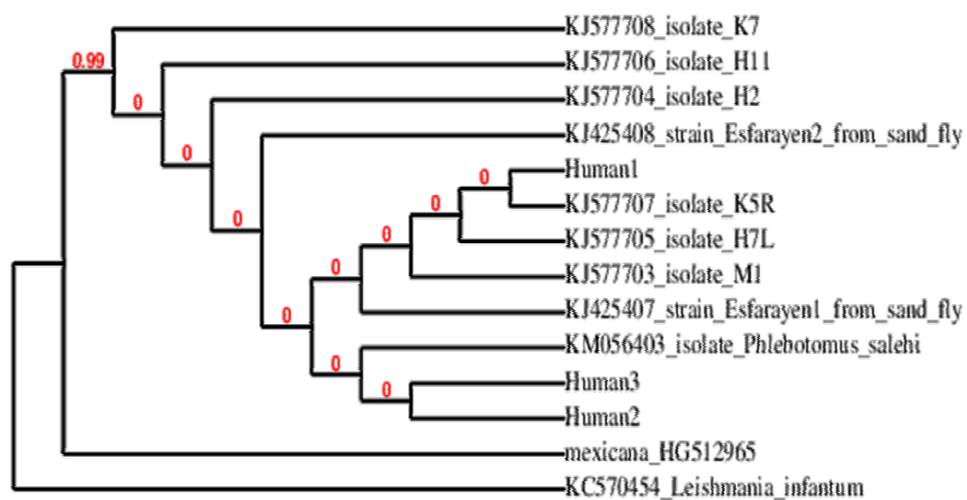
در شکل ۳-۲۲ می توان مشابهت ۱۰۰ درصدی انگل لیشمانیا ماژور سکانس شده از انسان را با شماره دسترسی

KM052753 با ۸ نمونه دیگر ثبت شده در بانک جهانی مشاهده کرد. علاوه بر آن انگل سکانس شده با نمونه

AJ30048۲ از کشور کنیا و **JX289844** از ایران نمونه انسانی، مشابهت ۱۰۰ درصدی داشت.



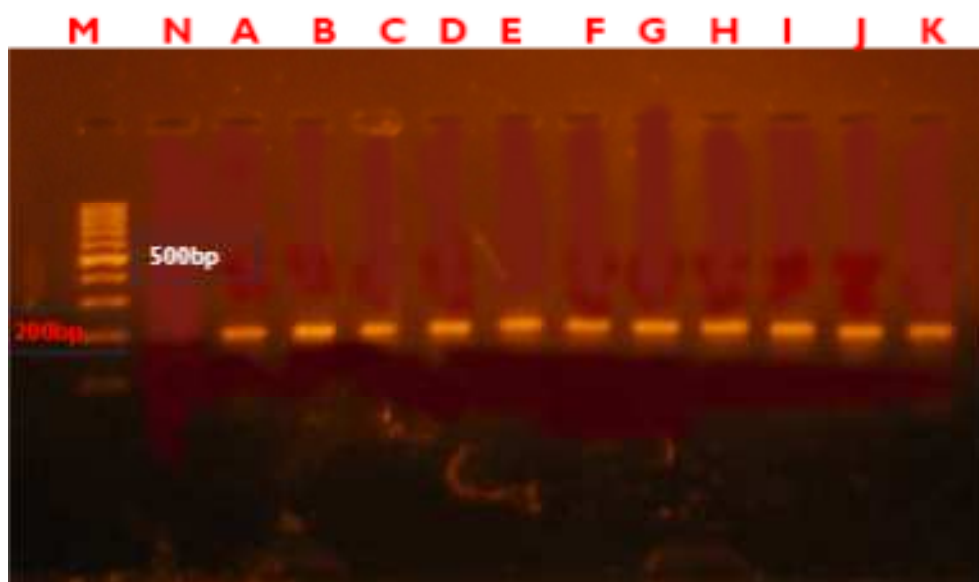
شکل ۳-۲۴: فیلوگرام انگل *L. major* شناسایی شده در انسان، ناقل و مخزن در مقایسه با نمونه های Genebank



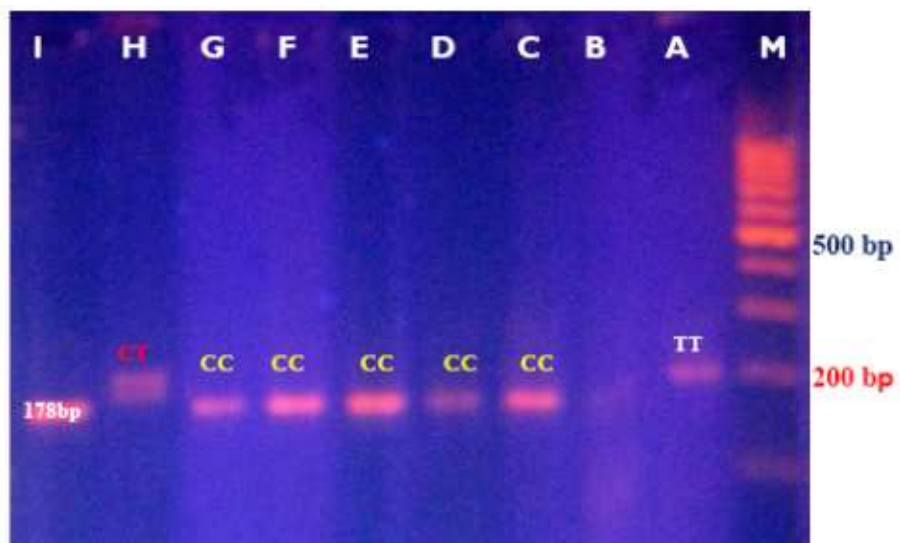
شکل ۳-۲۵: فیلوگرام انگل *L. major* شناسایی شده در انسان، ناقل و مخزن در مقایسه با نمونه های Genebank

۴: بررسی پلی مورفیسم اینتر لوکین ۴ (IL-4) در بیماران لیشمانیوز با تظاهرات کلینیکی مختلف:

تمامی ۵۰ نمونه انسانی PCR شده و باندی به طول 195bp تشکیل دادند (شکل ۴-۱). سپس تمامی این نمونه ها با آنزیم Avall برای انجام RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. اگر SNP نوکلئوتید C بود، این آنزیم قطعه نوکلئوتیدی ۱۹۵ جفت بازی را با یک برش به دو قطعه ۱۸ جفت بازی و ۱۷۷ جفت بازی برش می داد (شکل ۴-۲). از پنجاه نمونه مورد بررسی روی پنج گروه شامل: بیماران دارای زخم حاد، بیماران دارای زخم متوسط، بیمارانی که بیش از دو ماه از زمان درمان آنها گذشته است، بیمارانی که کمتر از دو ماه از زمان درمان آنها گذشته است و بالاخره گروهی که هیچ زخم بر روی آنها وجود نداشت، فقط ۴ مورد وجود داشت که RFLP آنها به صورت ناقص انجام شده بود (CT) و تنها یک مورد بود که RFLP در آن بی اثر بود و برشی صورت نگرفته بود (TT). تمامی ۴۵ نمونه دیگر کاملاً برش خورده بودند و ژنوتیپ همگی آنها به صورت CC بود. سه تا از نمونه های CT مربوط به بیمارانی بود که دارای زخم های حاد یا متوسط بودند و دیگر ژنوتیپ CT مربوط به نمونه ای بود که بیشتر از دو ماه از درمان او گذشته بود. بالاخره اینکه تنها نمونه با ژنوتیپ TT مربوط به نمونه انسانی بود که کمتر از دو ماه از زمان درمان او گذشته بود (جدول ۴-۱). این پنج نمونه متفاوت به همراه پنج نمونه کنترل از ژنوتیپ های CC برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. نتایج تعیین توالی موید RFLP بود. نتایج مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS-Version 18 و آزمون χ^2 (Non parametric) آنالیز شد. بر این اساس فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در پنج گروه از جامعه انتخابی متشکل از ۵۰ فرد با مشخصات ذکر شده نشان داد که فراوانی سه ژنوتیپ فوق در جامعه افراد انتخابی برای این پژوهش اختلاف بسیار معنی داری دارد ($\chi^2=56.4$; $df=2$; $p=0.000$) ولی فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در سه روستای انتخابی در شهرستان اسفراین متشکل از ۵۰ فرد اختلاف معنی داری نشان نداد ($\chi^2=5.6$; $df=2$; $p=0.062$). بررسی فراوانی ژنوتیپ های CC و CT در بین افراد انتخابی در گروه دارای بیش از دو زخم از سه روستا اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($\chi^2=1.3$; $df=1$; $p=0.248$) ولی فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در بین چهار گروه دیگر شامل افراد دارای دو زخم، افراد دارای کمتر از ۲ ماه طول درمان، افراد دارای بین ۲-۶ ماه طول درمان و افراد سالم اختلاف معنی دار ملاحظه شد ($\chi^2=4.5$; $df=1$; $p=0.035$).



شکل ۴-۱: نتیجه الکتروفورز ۱۱ نمونه در ژل دو درصد مربوط به پروموتور ژن اینترلوکین چهار انسانی. M: Ladder ۱۰۰ جفت باز مربوط به شرکت Fermentas، N: کنترل منفی، نمونه های A-C مربوط به افرادی با زخم های حاد، D و E مربوط به نمونه های با زخم های متوسط، F و G مربوط به نمونه های با درمان کمتر دوماه، H و I مربوط به نمونه های با درمان بیشتر از دو ماه، J و K مربوط به نمونه های بدون زخم .



شکل ۴-۲: نتایج چند نمونه مربوط به محصول RFLP پروموتور ژن اینترلوکین ۴ انسانی M : Ladder ۱۰۰ جفت باز شرکت Fermentas A : نمونه مربوط به ژنوتیپ TT، B-G و I : چند نمونه مربوط به ژنوتیپ CC، H : نمونه مربوط به ژنوتیپ TC

جدول شماره ۴-۱: تقسیم نمونه ها به گروههای پنجگانه و کد نمونه ها و نتیجه ژنوتیپ مربوط به SNP پرموتور

ژن اینترلوکین ۴

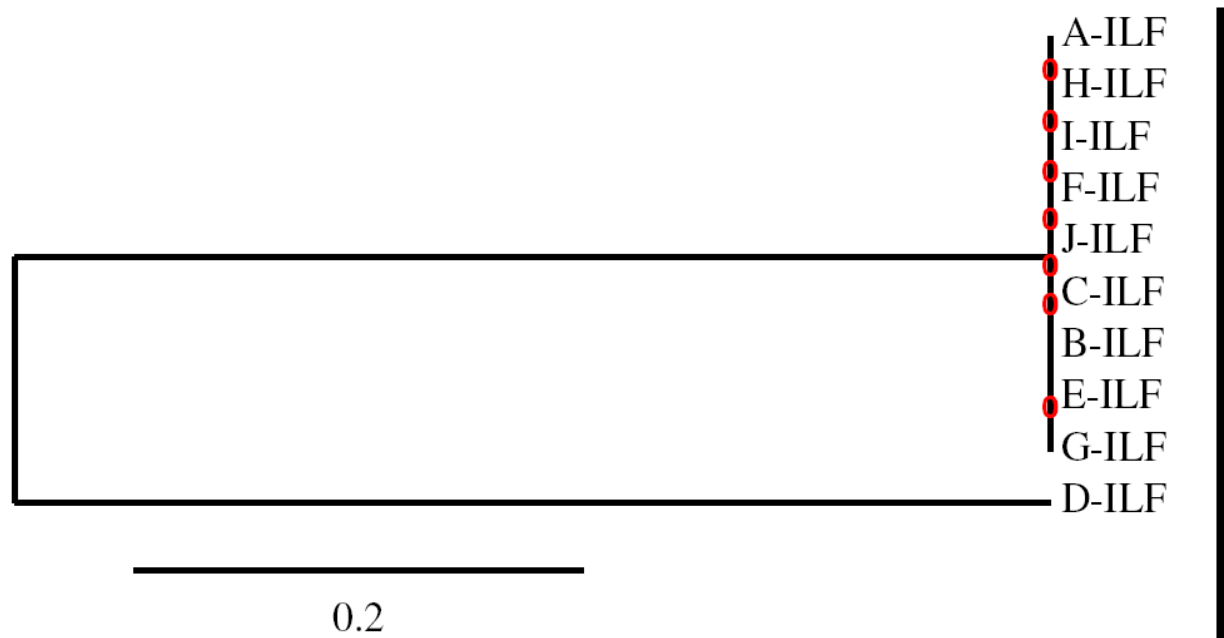
گروه ۱	نمونه ها	ژنوتیپ	گروه ۲	نمونه ها	ژنوتیپ	گروه ۳	نمونه ها	ژنوتیپ	گروه ۴	نمونه ها	ژنوتیپ	گروه ۵	نمونه ها	ژنوتیپ
زخم حاد قطر زخم ≤ 3 cm تعداد زخم ≤ 3	HA1	CC	زخم متوسط ق. زخم ≥ 1 cm تعداد زخم ≥ 2	HA6	CC	طول دوره درمان کمتر از دو ماه	HA3	CC	طول دوره درمان بین ۲-۶ ماه	HA4	CC	سالم بدون زخم یا اسکار	KR1	CC
	CH11	CT*		HA14	CT*		CH12	TT*		CH17	CC		KR2	CC
	CH4	CC		HA7	CC		CH17	CC		HA9	CC		KR4	CC
	CH5	CC		HA11	CC		KR3	CC		HA10	CC		KR5	CC
	HA13	CC		HA12	CC		CH2	CC		CH1	CT*		KR8	CC
	HA2	CC		CH6	CC		CH7	CC		CH10	CC		KR9	CC
	HA4	CT*		CH3	CC		CH2	CC		HA15	CC		KR10	CC
	HA8	CC		CH6	CC		CH13	CC		HA16	CC		KR11	CC
	KR6	CC		HA17	CC		CH14	CC		CH15	CC		KR12	CC
	KR7	CC		HA21	CC		CH12	CC		CH16	CC		HA8	CC

CH چهار برج

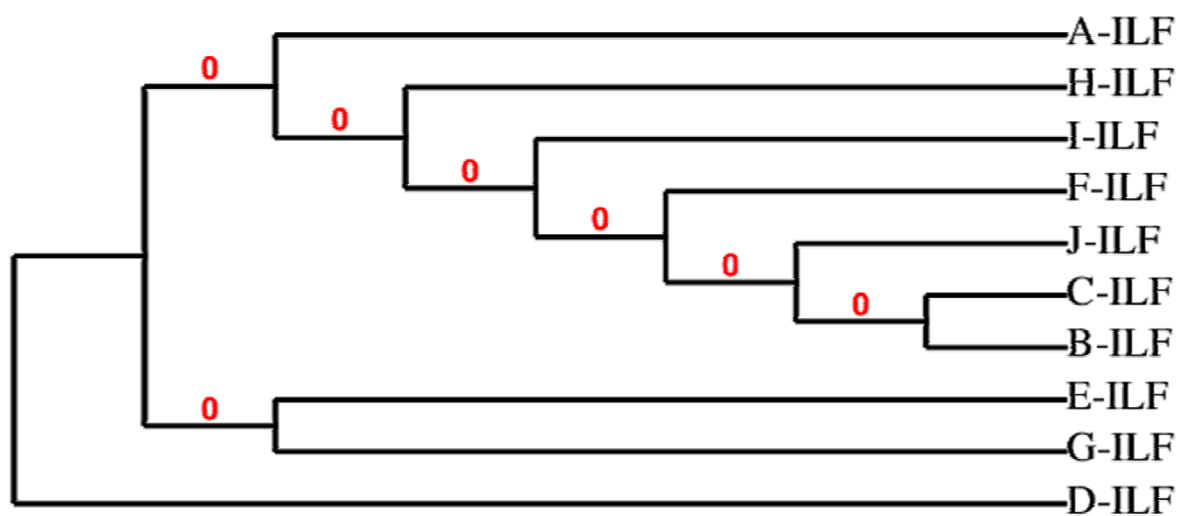
KR کلاته رضا

HA حسین آباد

در اشکال ۴-۳ و ۴-۴ فیلوگرام و کلادوگرام ژن پرموتور اینترلوکین چهار در بیماران لیشمانیوز در مقایسه با یکدیگر ملاحظه می گردد که داده های استخراج شده از PCR-RFLP و نتایج توالی نوکلئوتیدها را تایید کرد.



شکل ۳-۴: فیلوگرام ژن پروموتو اینترلوکین ۴ در نمونه های انسانی مبتلا به لیشمانیوز با تظاهرات کلینیکی مختلف



شکل ۴-۴: کلادوگرام ژن پروموتو اینتر لوکین ۴ در نمونه های انسانی مبتلا به لیشمانیوز با تظاهرات کلینیکی مختلف

فصل چهارم

بحث و پیشنهادات

کنترل بیماری لیشمانیوز در مناطق اندمیک بیماری نیازمند آگاهی از اکولوژی و اپیدمیولوژی انگل، مخزن و نیز ناقل بیماری دارد. در این راستا شناسایی مخازن و ناقلین آلوده یکی از مشکلات اساسی اپیدمیولوژیست ها محسوب می شود. یافتن پشه خاکی های آلوده به انگل، گامی اساسی در شناسایی گونه های ناقل و نیز پتانسیل انتقال بیماری در مناطق اندمیک می باشد.

روش استفاده از پرایمرهای اختصاصی لیشمانیا و تکثیر بخش های هدف ژنوم به عنوان یک روش جایگزین روش تشریح میکروسکوپی متداول پشه خاکی مطرح است. چرا که در روش کلاسیک سختی کار، حجم زیاد نمونه ها و امکان آلودگی انگل جدا شده مطرح است. افزون بر آن بعد از جدا سازی موفقیت آمیز انگل بایستی با کمک روشهای مولکولی مانند تکنیک PCR و یا روش ایزوآنزیم به تعیین هویت انگل اقدام نمود. روش تعیین هویت انگل از طریق ایزوآنزیم ها هنوز هم به عنوان روش Gold Standard در شناسایی گونه ها و زیرگونه های انگل لیشمانیا استفاده میشود ولی این روش پروسه ای وقت گیر و پرهزینه است که نیازمند کشت اولیه انگل و ازدیاد آن در شروع کار و انجام تست در آزمایشگاههای اختصاصی و بین المللی مورد تایید می باشد. مهمترین مزایای روش های مولکولی حساسیت و ویژگی آن، عدم وابستگی آن به تعداد، مرحله انگل و همچنین محل حضور انگل لیشمانیا در لوله گوارش ناقل می باشد. مطالعه حاضر ترکیبی از کارهای میدانی و آزمایشگاهی بوده است. در این بررسی، برای تشخیص آلودگی لپتومونادی پشه خاکی ها و تعیین هویت انگل جدا شده از جونده و انسان از روش حساس Nested PCR و از پرایمرهای طراحی شده توسط Noyes و همکاران (۱۴۲) استفاده شد. این پرایمرها بر اساس ناحیه حفاظت شده حلقه های کوچک kDNA (Minicircle) طراحی شده و برای انگل های *Leishmania infantum* و *Leishmania donovani* محصول PCR به طول ۶۸۰ bp، برای انگل *L. tropica* طول باند ۷۵۰ bp و برای انگل *L. major* طول باند ۵۶۰ bp ایجاد می نماید. به علت اینکه از این قسمت از ژنوم به تعداد زیادی در انگل موجود می باشد لذا برای یافتن آلودگی اولیه بسیار مناسب است. تکثیر حلقه های کوچک kDNA از لحاظ مثبت شدن انگل و نشان دادن آلودگی خیلی مناسب است اما به لحاظ متغیر بودن ماهیت ژنتیکی Minicircle و تفاوتهایی که حتی در حلقه های یک انگل لیشمانیا وجود دارد تعیین توالی این

بخش از ژنوم انگل سخت یا امکان پذیر نمی باشد. در این مطالعه به منظور تعیین هویت گونه های انگل لیشمانیا، از ژن rDNA که بخشی از ژنوم هسته است با روش Conventional PCR نیز استفاده و محصول آن تعیین توالی گردید. همچنین با استفاده از آنزیم HaIII گونه ها از هم تفکیک شد. در روش PCR-RFLP آنزیم های اندونوکلاز رشته DNA را در محل های خاصی مورد شناسایی قرار داده و قطع می کنند و به این خاطر این آنزیم ها را قیچی های بیولوژیک می نامند و این محل های خاص روی مولکول DNA به جایگاه های تشخیص (Recognition site) مرسوم هستند. روش PCR-RFLP می تواند روش بسیار مناسبی به منظور تعیین گونه باشد و با استفاده از این روش در وقت و هزینه صرفه جویی نیز به عمل می آید بطوریکه دیگر نیاز به مقدار زیاد محصول PCR و همچنین تعیین توالی ضرورتی ندارد.

این مطالعه مدون به منظور بررسی آلودگی انسانی، تعیین ناقلین و مخازن بیماری با استفاده از روش های Conventional & Nested PCR و PCR-RFLP و همچنین تعیین توالی (Sequencing) در کانون های لیشمانیوز روستایی در شهرستان اسفراین در سالهای ۱۳۹۲-۹۳ انجام شد و نشان داد که استفاده از تکثیر Minicircle می تواند در تعیین آلودگی اولیه پشه خاکی ها، عفونت انسانی و مخازن بخوبی عمل کند. همچنین با استفاده از روش تکثیر ژن ITS1 به همراه RFLP در جهت تایید گونه های انگل لیشمانیا اقدام نمود.

یکی از اهداف این رساله ردیابی آلودگی پشه خاکی ها به عنوان ناقلین عامل بیماری به انگل لیشمانیا به روش ملکولی بوده که نتایج آن حاکی از آلودگی گونه *P.papatasi* به دو گونه انگل *L. major*, *L. turanica* و پشه خاکی *P.salehi* به انگل *L. major* بود.

نتایج آلودگی گونه فلبوتوموس پاپاتاسی در این مطالعه در تطابق با لیست ارائه شده از گونه های لیشمانیای گزارش شده در جریبل ها و فلبوتوم های مناطق مجاور در ایران و کشورهای همسایه شامل قزاقستان، ازبکستان و ترکمنستان می باشد (۳۰، ۱۴۳، ۱۴۴)

اخیراً "آلودگی فلبوتوموس پاپاتاسی به انگل *L. infantum* برای اولین بار در دنیا در یکی از کانون های اندمیک لیشمانیوز جلدی در استان فارس گزارش شده است در حالی که انگل فوق عامل لیشمانیوز احشائی در کشور و دنیا شناخته شده است (۱۴۵).

بر اساس گزارشات دویسون و همکاران (۲۰۱۰) گونه فلبوتوموس پاپاتاسی به عنوان یک گونه restricted می باشد بطوریکه فقط توانائی انتقال لیشمانیا میجر را به میزبان انسانی و یا حیوانی را دارد (۱۴۶).

این گونه در ایران، در اطراف خانه ها و در مناطق لانه های جوندگان و درون لانه رومبومیس اوپیموس به فراوانی یافت می شود (۷۱، ۳۶، ۱۳، ۱۲).

در مطالعه حاضر، ما موفق به یافتن DNA انگل های لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا میجر در فلبوتوموس پاپاتاسی شدیم. این یافته ها در تناقض با مفهوم انتقال انحصاری لیشمانیا میجر به صورت restricted می باشد، اما در عین حال در تطابق با یافته های دیگر محققین در ایران و جهان بود (۱۴۳، ۳۶، ۳۰).

این محققین ابراز داشته اند که ممکن است انگل های لیشمانیا میجر و لیشمانیا تورانیکا، هر دو توسط فلبوتوموس پاپاتاسی منتقل شوند. از طرف دیگر گزارش الودگی این گونه به انگل لیشمانیا انفتوم بیانگر پتانسیل این پشه خاکی در حمایت از گونه های مختلف انگل لیشمانیا را دارد و نیازمند بررسی های بیشتر است.

در سال ۲۰۰۸، پرویزی و Ready آلودگی فلبوتوموس پاپاتاسی را به انگل های *L. turanica* , *L. gerbili* گزارش و فرضیه انتقال لیشمانیا تورانیکا توسط فلبوتوموس پاپاتاسی به انسان را مطرح کردند. بررسی ها بیانگر این نکته است که انگل لیشمانیا تورانیکا اهمیت فوق العاده ای در حفظ آلودگی به انگل لیشمانیا میجر در جریبل ها دارد (۱۴۴). اگر ثابت شود که لیشمانیا تورانیکا و یا لیشمانیا جریبلی و یا هر دو توسط فلبوتوموس پاپاتاسی و یا دیگر گونه ها به انسان منتقل می شود، لازم است نقش این انگل ها در نگه داری آلودگی به لیشمانیا میجر و یا افزایش و کاهش شدت پاتوژنیسیته و ویروالانس لیشمانیا میجر در انسان نیز توسط محققین مورد بررسی قرار گیرد. بر اساس یافته های موجود شامل: انتقال بالقوه لیشمانیا تورانیکا توسط فلبوتوموس پاپاتاسی، وابستگی فیلوژنتیکی و مشابهت های ژنتیکی بسیار زیاد بین سه گونه انگل لیشمانیا میجر، تورانیکا و جریبلی (۳۰) و اینکه مخزن مشترک هر سه انگل جونده گونه رومبومیس اوپیموس می باشد (۲۵، ۱۴۳، ۱۴۴) می توان حدس زد که فلبوتوموس پاپاتاسی

یک ناقل restricted نمی باشد و حداقل می تواند همه انگل های رومبومیس اوپیموس را به میزبان های خود منتقل کند. این وضعیت احتمالا به خاطر عدم وجود ساختار چند شکلی LPG و یا عدم وجود سایر موانع تکاملی در این سه گونه انگل می باشد (۱۴۷). بدیهی است برای تایید کامل این وضعیت به مطالعات بیشتری نیازمند است.

بر اساس نتایج این مطالعه شامل: وفور بالا، صید توام از اماکن داخلی، خارجی، و لانه جوندگان، آلودگی به انگل لیشمانیا ماژور، خالی بودن شکم، تعیین هویت انگل از طریق دو روش حساس مولکولی (ITS1-RFLP, kDNA)، سکانس انگلها و داده های موجود توسط دیگر محققین، گونه *Phlebotomus papatasi* به عنوان ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی در منطقه به انسان معرفی می گردد و با توجه به ماهیت انگل جدا شده که *L. major* میباشد لیشمانیوز شایع در منطقه از نوع روستائی گزارش میشود.

فلبوتوموس صالحی دومین گونه از پشه خاکی ها بود که در یک نمونه از آن انگل لیشمانیا ماژور مشاهده شد. وفور این فلبوتوموس بسیار کم بوده و فقط از لانه جوندگان صید شد. این پشه خاکی که بیشتر در افریقا شایع می باشد در جنوب و جنوب شرقی ایران نیز آلوده به لیشمانیا ماژور گزارش شده است.

این پشه خاکی در کانون های معدودی از لیشمانیوز جلدی روستائی در کنار فلبوتوموس پاپاتاسی گزارش شده است (۱۴۸، ۱۴۹).

با توجه به وفور کم این گونه و حوزه فعالیت آن که در لانه جوندگان می باشد به نظر میرسد نقش ثانویه در حفظ سیکل وحشی لیشمانیوز را داشته و در چرخه انگل لیشمانیا در میان جمعیت جوندگان (رومبومیس اپیموس) به عنوان ناقل ثانویه مطرح است. این اولین گزارش آلودگی طبیعی فلبوتوس صالحی به لیشمانیا ماژور به روش مولکولی در شهرستان اسفراین از استان خراسان شمالی می باشد.

بر اساس نتایج مطالعه کنونی، نتیجه Align ژن ITS1 انگل لیشمانیا ماژور در معده *P. salehi* مشابهت ۱۰۰٪ و پوشش ۱۰۰٪ با این قسمت از ژن لیشمانیا ماژور ثبت شده در ایران و جهان داشت (شماره دسترسی: FR796423).

در بررسی مخازن حیوانی که با استفاده از تله های زنده گیر شرمین انجام گرفت دو گونه جونده شامل *R. opimus*

و *M.libycus* صید شد که در حدود ۷۳ درصد آنها را رومبومیس اپیموس تشکیل میداد. در بررسی آلودگی آنها که به روش میکروسکوپی و مولکولی با استفاده از ژن های ITS1, kDNA انجام گرفت و تمامی نمونه های رومبومیس اپیموس نسبت به انگل *L.major* مثبت و نتایج حاصل از سکانس انگل ها در ژل آگاروز نیز مؤید آلودگی آن ها به انگل لیثمانیا ماژور بودند. با سکانس این انگلها مشخص شد که صد در صد مشابهت با لیثمانیا ماژور مشاهده شده در پشه خاکی ناقل *P.papatasi* با شماره های دسترسی KJ425407, KJ425408 داشتند و ژنوتیپ آنها از لحاظ لوکوس های ITS1 کاملاً مشابه بود که موید همسانی انگل در مخزن و ناقل اصلی بیماری در منطقه مطالعه بود. در گونه مریونس لیبیکوس آلودگی به روش میکروسکوپی و مولکولی مشاهده نشد. به طور کلی رومبومیس اپیموس و مریونس لیبیکوس به عنوان مخازن اصلی لیثمانیا ماژور در ایران گزارش شده اند، اما دیگر جوندگان همانند تاترا ایندیکا، نزوکیا ایندیکا، مریونس هوریانه، مریونس پرسیکوس و گونه های مختلف جربیل به عنوان مخازن لیثمانیا ماژور مورد توجه هستند. از نظر جغرافیائی این جوندگان مخزن در مناطق مختلفی از ایران قرار دارند، به طوری که رومبومیس اپیموس در کانون شمال شرق و مناطقی از مرکز ایران، مریونس لیبیکوس و در مرکز و جنوب غرب ایران، مریونس هوریانه در جنوب شرق ایران و تاترا ایندیکا در جنوب و جنوب غرب، میزبان مخزن انگل می باشند (۱۲، ۱۳).

مطالعات قبلی نشان داده که جمعیت های مختلف رومبومیس اپیموس آلوده به انگل *L.major* تفاوت های معناداری را از لحاظ پارازیتی و علائم بالینی با یکدیگر نشان می دهند (۱۴، ۲۵). تفاوت در میزان نگه داری پاتوژنهای دیگر مثل باسیل طاعون و یا ویروس تب دره ریف در جمعیت های مختلف جوندگان مخزن این بیماریها قبلاً ذکر شده است (۱۵۰، ۱۵۱، ۱۵۲، ۱۵۳).

با توجه به وفور بالای جونده رومبومیس اپیموس (۷۳٪) در منطقه مورد مطالعه، تایید آلودگی آن به روشهای میکروسکوپی و مولکولی و همسانی صددرصدی انگل مشاهده با ناقل، این جونده به عنوان مخزن اصلی و قطعی لیثمانیوز جلدی با عامل لیثمانیا ماژور معرفی می گردد و این جونده رل اصلی در چرخش انگل در بین ناقلین و جوامع انسانی حاضر در منطقه مورد مطالعه را ایفا میکند.

در بررسی نمونه های زخم موارد انسانی در منطقه که به هر دو روش میکروسکوپی و مولکولی انجام شد، گونه انگل، *L.major* تشخیص داده شد. در مقایسه نتایج حاصل از سکانس این انگل باموارد حاصل در ناقلین و مخازن

در همان منطقه در ژن ITS1 مشابهت ۹۹ در صدی مشاهده شد. (شماره های دسترسی KJ425406, KJ425406, KJ425408) این یافته مؤید همسانی نمونه های انگلی مشاهده شده در سه حلقه بیولوژیک عامل بیماری (*L. major*) شامل انسان-ناقل-مخزن بود. لازم به توضیح است که انگل سکانس شده از انسان با تعداد زیادی از موارد ثبت شده در بانک جهانی شامل KM052753, FR796423, FJ753394, KF981806, DQ295825 و مشابهت صد در صدی در لوکوس ITS1 مربوط به لیشمانیا ماژور داشت.

یکی از مهمترین اهداف این رساله بررسی پلی مرفیسم ژن پروموتراپینتر لوکین ۴ (IL4) در نزد بیماران با سیمای کلینیکی متفاوت بود. این مطالعه در بین ۵۰ نفر شامل ۵ گروه ۱۰ تایی (بیماران با بیش از دو زخم حاد، بیماران دارای دو زخم متوسط، بیمارانی که طول دوره درمان آنها بین ۲-۶ ماه بود، بیمارانی که طول دوره درمان آنها کمتر از ۲ ماه بود و بالاخره گروهی که هیچ زخم بر روی آنها وجود نداشت) انجام گرفت. کلیه نمونه ها از نظر لوکوس اینترلوکین ۴ و استفاده از آنزیم (Aval= Eco47I) و ارسال محصولات PCR جهت سکانس و توالی نوکلئوتیدها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسیها حاکی از وجود سه نوع ژنوتیپ شامل CC، CT و TT بود بطوریکه ۹۰ درصد نمونه CC، ۸ درصد CT و ۲ درصد آنها TT بودند. در گروه سالم و بدون زخم فقط ژنوتیپ CC، در گروه طول دوره درمان کمتر از ۲ ماه دو ژنوتیپ TT (۱۰٪) و CC (۹۰٪)، در گروه طول دوره درمان بین ۲-۶ ماه دو ژنوتیپ CT (۱۰٪) و CC (۹۰٪)، در افراد با بیش از دو زخم دو ژنوتیپ CT (۲۰٪) و CC (۸۰٪) و در افراد با دو زخم دو ژنوتیپ CT (۱۰٪) و CC (۹۰٪) مشاهده شد.

نتایج مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS-Version 18 و آزمون χ^2 (Non parametric) آنالیز شد. بر این اساس فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در پنج گروه از جامعه انتخابی متشکل از ۵۰ فرد با مشخصات ذکر شده نشان داد که فراوانی سه ژنوتیپ فوق در جامعه افراد انتخابی برای این پژوهش اختلاف بسیار معنی داری دارد ($\chi^2=56.4$; $df=2$; $p=0.000$) ولی فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در سه روستای انتخابی در شهرستان اسفراین متشکل از ۵۰ فرد اختلاف معنی داری نشان نداد ($\chi^2=5.6$; $df=2$; $p=0.062$). بررسی فراوانی ژنوتیپ های CC و CT در بین افراد انتخابی در گروه دارای بیش از دو زخم از سه روستا اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($\chi^2=1.3$; $df=1$; $p=0.248$) ولی فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در بین چهار گروه دیگر شامل افراد

دارای دو زخم ، افراد دارای کمتر از ۲ ماه طول درمان ، افراد دارای بین ۲-۶ ماه طول درمان و افراد سالم اختلاف معنی دار ملاحظه شد ($\chi^2=4.5$; $df=1$; $p=0.035$).

مطالعات قبلی بیانگر این بودند که IL4 نقش برجسته ای در تحریک سلول های TH2 در موش های بالبی که عفونت *L.major* را داشته اند. بعضی از مطالعات حاکی از اینست که اگر ماکروفاژهای این موش ها قبلاً بوسیله IL4 تقویت میشدند میتوانست سبب بلوکه شدن توانمندی IFNg در ماکروفاژها شده و در نتیجه ماکروفاژ فعال نمیشدند و لذا توان کشتن *L.major* داخل سلولی را از دست میدادند. بر خلاف این مطالعه ، نتایج حاصل از موش های ترانس ژن IL4 و یا موش هایی که نقص در این ژن داشته اند نشان داده که تولید اولیه این سایتو کاین باعث گسترش و توسعه TH1 میشود و یا سبب تقویت افزایش حساسیت تاخیری می گردد که همه اینها منجر به مقاومت به انگل *L.major* میگردد. (۵۴ ، ۱۲۳ ، ۱۵۵ ، ۱۵۶). این اثر هم افزایشی IL4 و گاما اینترفرون در فعال سازی ماکروفاژها برای کشتن انگل داخل سلولی لیشمانیا مازور در مطالعات دیگر هم گزارش شده بود. در واقع گفته شده است که حضور IL4 در مراحل اولیه سیر تکاملی دندریت سل ها سبب تحریک تی سل ها میشود و تولید IL12 و نهایتاً افزایش پاسخ سلول های Th1 را بدنبال خواهد داشت. بنابر این افرادی که بطور ژنتیکی سطح IL4 آنها پایین است (ژنوتیپ CC) ممکنست که پاسخ Th1 خوبی نداشته باشند و لذا احتمال مستعد بودن آنها به عفونت و بیماری لیشمانیا در مقایسه با افرادی که اینترمدیت هستند (ژنوتیپ CT) و یا تولید بالای این سایتو کاین (ژنوتیپ TT) را دارند ، بیشتر است. (۱۲۶).

سلول های Th1 با ترشح سیتوکاین هایی نظیر اینترلوکین-۲ (IL-2) و اینترفرون-گاما باعث افزایش فعالیت های ایمنی سلولی، و سلول های Th2 با ترشح سیتوکاینهایی نظیر IL-4، IL-5 و IL-10 کمک لازم را برای تولید پاسخ های ایمنی هومورال و فعال شدن سلول های B فراهم می نمایند (۱۲۲). Th1 و Th2 از یک پیش ساز اولیه Th0 مشتق می شوند که می تواند انواع سیتوکاین های Th1 و Th2 را ترشح کند. مطالعات اخیر بیانگر دو نقش متضاد IL4 بوده و نشانگر این است که سطح و میزان ترشح و تولید IL4 نقش مهم و حیاتی در ایفای دو نقش متضاد آن دارد، بطوریکه اگر مقدار ترشح IL4 در مراحل اولیه ورود انگل لیشمانیا (و یا هر انگل داخل سلولی) اتفاق بیافتد چون در این مرحله DC ها در حال فعال شدن هستند ، در نتیجه فعال شدن آنها Th1 تولید میشود و لذا تولید سایتو کاین های IL12 و INF- γ افزایش می یابد و موش های آلوده به انگل قادر به مهار و کنترل بیماری میشوند. همچنین بررسی ها نشان داد حتی با وجود تولید اولیه IL4، در صورت فقدان یا نقص در گیرنده IL4 α سلول های دندریت (DC) نتیجه به سمت تولید Th2 پیش خواهد رفت و بیماری در موش آلوده گسترش می یابد. این نتایج

بوسیله مطالعات دیگری هم تایید شد. وقتی به موش IL4Adjuvant تزریق شد، اثرات واکسن بدست آمده از IL12-Mediated Vaccine را تقویت نموده و حتی مشخص شد که اگر این واکسن به تنهایی استفاده شود غیر موثر است در حالیکه اگر با ALUM که یک عامل تحریک کننده IL4 است همراه گردد موثر و کارا خواهد بود (شکل ۱-۱۲). (۱۲۳). سلول های ارائه دهنده آنتی ژن (APC) مثل DC ها میتوانند باعث تحریک رده خاصی از T سل ها شوند. خود APC ها هم تحت تاثیر سیگنال های حاصل از سیستم ایمنی (Innate) ذاتی و غیر اختصاصی هستند. آن دسته از APC ها که قادر به دریافت و ایجاد سیگنال برای تمایز سلول های Th0 به Th1 می باشند، باعث مقاومت در برابر انگل شده که به آنها DC1 میگویند. APC ها همچنین بوسیله اثرات IL4 بطور انتخابی و تاثیر گذار توسعه می یابند، یعنی اگر در مراحل اولیه رویارویی سلول با انگل *L.major* که مرحله اول فعال شدن دندریت سل هاست، IL4 ترشح مناسبی داشته باشد، نهایتاً منجر به افزایش Th1 میگردد و این مسئله باعث میشود که تعداد آنها افزایش یابد و لذا به عنوان یک فید بک مثبت در جهت بهبود و کنترل بیماری عمل کند و از طرف دیگر IL4 میتواند واکنش حساسیت تاخیری (DTHR) را هم افزایش دهد. با بررسی ایمونولوژی عفونت لیشمانیا در کل چنین بنظر میرسد که برخلاف تئوری های قبلی که یک رابطه تعریف شده بین Th1 و Th2 را عنوان میکرد این مسیرها یک سری مسیرهای ارتباطی متقابل و تعاملی پیچیده هستند (۱۲۳).

در راستای فرضیات فوق الذکر نتایج مطالعه حاضربراین مورد اشاره دارد که وجود پلی مرفیسم اینترلوکین ۴ در بین افراد کاملاً محرز میباشد و وجود سه ژنوتیپ مختلف CC، TT، CT مویید این مسئله بود. در این بررسی فراوانی ژنوتیپ CC بسیار بالا (۹۰٪) درمقایسه بادورژنوتیپ دیگر مشاهده شد و مهمتر اینکه افراد سالم و فاقد زخم دارای ژنوتیپ حساس به لیشمانیا (CC) بودند که خارج از انتظار ما بود. در توجیه این مورد می توان به اندمیسیته این بیماری با توجه به شیوع بیماری در گروه های سنی مختلف اشاره کرد که بنظر می رسد منطقه مورد مطالعه وضعیت هیپو اندمیک داشت. بعلاوه با وجود اینکه نرخ بیماری در بین جونده رومبومیس اپیموس بالا بوده ولی نرخ بیماری در بین ناقلین نسبتاً پایین می باشد بنابراین احتمال دارد افراد سالم انتخابی در این بررسی، گزش های آلوده دریافت نکرده اند لذا فاقد زخم بودند. بدیهی است اگر این مطالعه در یک کانون هیپر اندمیک مانند اصفهان انجام می گرفت، با توجه به نرخ آلودگی بسیار بالا در مخازن عامل بیماری و البته ناقلین لیشمانیا و افزایش احتمال گزش های آلوده برای انسان نتایج دیگری حاصل می شد. در هر صورت در این بررسی فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT در بین چهار گروه مطالعه شامل افراد دارای دو زخم، افراد دارای کمتر از ۲

ماه طول درمان ، افراد دارای بین ۲-۶ ماه طول درمان و افراد سالم اختلاف معنی دار داشت و بیانگر تاثیر آن در تظاهرات کلینیکی و میزان پاسخ آن به زمان درمان داشت.

در خاتمه اینکه ، برای نتیجه گیری دقیق جهت بررسی پلی مرفیسم اینتر لوکین ۴ و تاثیر آن در حدت عامل بیماری لازم است در مناطق اندمیک کشور چندین کانون با اندمیستی مختلف هیپو ، مزو ، وهیپراندمیک انتخاب گردد.

نتیجه گیری:

بر اساس یافته های این رساله :

- ۱- لیشمانیوز شایع در منطقه از نوع جلدی روستائی (CLM) و عامل آن *Leishmania major* بود.
- ۲- گونه فلبوتوموس پاپاتاسی (*Phlebotomus papatasi*) ناقل اصلی و قطعی عامل بیماری لیشمانیوز (*Leishmania major*) به انسان معرفی شد.
- ۳- آلودگی میکس به انگلهای *Lmajor/turanica* در گونه ناقل فلبوتوموس پاپاتاسی مشاهده شد.
- ۴- گونه فلبوتوموس صالحی (*Phlebotomus salehi*) به عنوان ناقل ثانویه عامل بیماری لیشمانیوز (*Leishmania major*) معرفی شد و بنظر می رسد در نگهداری سیکل بیماری در بین جمعیت مخازن بیماری (*Rhombomys opimus*) نقش اساسی دارد.
- ۵- جونده رومبومیس اپیموس (*R.opimus*) با توجه به فراوانی و آلودگی آن به انگل لیشمانیا ماژور به عنوان مخزن اصلی عامل بیماری سالک در منطقه گزارش می گردد و گونه مریونس لیبیکوس (*Meriones libycus*) به عنوان مخزن مشکوک مطرح می باشد.
- ۶- بر اساس یافته های میدانی ، آزمایشگاهی ، ملکولی و توالی نوکلئوتید ها، همسانی انگل *Leishmania major* در تمامی حلقه های بیو اپیدمیولوژیک بیماری مشاهده شد.
- ۷- بررسی پلی مرفیسم ژن اینتر لوکین ۴ (IL4) در نزد بیماران با سیمای کلینیکی متفاوت نشان داد فراوانی ژنوتیپ های CC ، CT و TT در بین چهار گروه دیگر شامل افراد دارای دو زخم و بیشتر ، افراد دارای کمتر از ۲

ماه طول درمان ، افراد دارای بین ۲-۶ ماه طول درمان و افراد سالم اختلاف معنی دار داشتند. ($\chi^2=4.5$; $df=1$; $p=0.035$).

پیشنهادهات:

۱- بررسی پلی مرفیسم اینتر لوکین ۴ در مناطق مختلف ایران با اندمسیته متفاوت بیماری شامل مناطق هیپر اندمیک، مزو اندمیک و هیپو اندمیک و تاثیر آن در تظاهرات کلینیکی بیماری.

۲- بررسی پلی مرفیسم اینتر لوکین ۴ در مخازن عامل بیماری در کانون های مختلف کشور.

۳- بررسی آلودگی میکس ناقلین و مخازن عامل بیماری و تاثیر آن در شدت و حدت بیماری در انسان

English Summary:

Introduction: In the field of leishmaniasis control, it is considered one of the most neglected tropical diseases in the world. At present, 98 countries are infected with various types of the disease. Cutaneous leishmaniasis (CL) is an old endemic disease in Iran. The disease is observed in two forms of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) and Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL). Zoonotic cutaneous leishmaniasis is endemic in 17 provinces of Iran. One of the major foci of the disease has been located in the northern Khorassan province, including rural areas of Esfarayen county. Despite the passing of half a century of knowledge on cutaneous leishmaniasis in the Esferayen and despite various interventions to control of the disease, its incidence has been remained in high level in the region. According to the Passive case finding was conducted during the year of 1389, more than 500 cases of cutaneous leishmaniasis have been reported from this area.

This study was carried out during the years of 1392-93 with emphasizing to molecular determination of vectors, reservoirs and human infected cases. Relationship between IL-4 polymorphism (promoter) and clinical aspects of disease was the other important objective of this study.

Material & Methods: Sand flies were collected using sticky traps and its infection to leishmania parasites was determined by employing of molecular methods using the loci of kDNA, ITS1. The identification of sand fly specimens was performed using validated keys. The extraction of *Leishmania* DNA from female sand flies was performed by Qiagene kit. Rodents were captured using Sherman live traps and their infection to leishmania were tested against the loci of kDNA, ITS1. To investigate of human infection to *Leishmania*, parasites slides were prepared from 40 patients with acute wounds. Positive slides for leishmania were checked by molecular methods on loci of kDNA and ITS1. In order to determine of polymorphisms of interleukin 4 promoter (IL-4) in leishmaniasis cases with different clinical symptoms, Treatment time fifty human blood samples were prepared. All samples were tested by PCR and followed using restriction enzyme

of Eco47I. The results of the study were analyzed using, SPSS software, Version18 and χ^2 Non parametric test. To detection of the genetic diversity of the parasites , all samples were sequenced by Bioneer drawing Corporation, South Korea . Analysis of gene sequences and registration was done via the site of www.ncbi.nih.gov.org. For of phylogram and cladogram , the software of CLUSTALw was used via www.ebi.ac.uk/clustalw site.

Results: In determining the vectors of Leishmaniasis and its infection rate , among the 390 female sand flies, four specimens (1.02%) including *phlebotomus papatasi* and *P.salehi* were found positive to *leishmania major* and *L.turanica*. one specimen of *P.papatasi* had a mixed infection with two mentioned parasite. All sequenced samples of *L.turanica* and *L.major* were 100% similar comparison to other registered samples in the gene bank. According to the results, two species of *Phlebotomus papatasi* and *P. salehi* were introduced as the primary and secondary vectors of disease respectively. In the study of disease reservoirs a total of 44 rodents, including two species of *Meriones libycus* (27%) and *Rhombomys opimus* (73%) were trapped. Our PCR result showed , all positive slides from *R.opimus* were *L.major* . Six positive ITS1-PCR samples are registered in world gene bank with accession numbers of KJ577703, KJ577704, KJ577705, KJ577706, KJ577707 and KJ577708. All samples were quite similar to each other in terms of sequence , and also they were 100% similar with infected sand flies specimens to *L.major* . All prepared samples from *Meriones libycus* were negative to *Leishmania* parasite. In the study of human infection to *Leishmania*, all prepared slides from human lesions were detected *L.major* by molecular technique. Three of these samples were sent for sequencing and the results were registered in world gene bank. It is available with accession number of KM052753.

In order to determine of polymorphisms of interleukin 4 promoter (IL-4) in patients with different clinical symptoms , fifty human blood samples were prepared. All cases were classified into five group including :cases with acut lesions, cases with mild lesions, cases with treatment duration \leq two months , cases with treatment duration \geq months and healthy samples. All 50 human samples were tested by PCR and followed using restriction enzyme of Eco47I.If the SNP of nucleotide was C, the enzyme was cut the nucleotide fragment of 195

bp , into two fragments of 18 bp and 177 bp. Among the tested samples , four patients (8%) were found with incomplete RFLP (CT) ,one cases (2%) with no restriction , (TT) and 45 cases with complete RFLP(CC). Our result indicated ,There was a significant difference on frequencies of three alleles (CC, CT, TT) in studied group ($\chi^2=56.4$; df=2 ; p=0.000).

Discussion: In the present study, we succeeded in to find the DNA of the *Leishmania turanica* and *Leishmania major* in *P.papatasi* . These findings was inconsistent with concept of exclusive transmission of *Leishmania major* by *P.papatasi*, but it was in accordance with the findings of other researchers in Iran and the world. Due to the abundance of *R. opimus* (73%) in the study area, Confirmed its infection to *L.major* by microscopic and molecular techniques and 100% similarity of it with observed *leishmania* parasite in vectors , This rodent is introduced as a major reservoir of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. So, they Plays a major role in circulating of parasite between the vector and the residents in the study area. In the study of IL-4 promoter polymorphism , analysis of genotype frequency of CC, CT and TT in five groups of our selected society, showed highly significant differences($\chi^2=56.4$; df=2 ; p=0.00). Our results showed , there was not a significant correlation between IL-4 promoter genotype with clinical disease symptoms and treatment time.

منابع انگلیسی و فارسی

۱. شیرزادی م ر، مجبعلی م، یعقوبی ارشادی م ر، فیروزع، شریفی ا، فکری ع و همکاران. راهنمای مراقبت لیشمانیوز جلدی (سالک) در ایران. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت بهداشتی، مرکز مدیریت بیماری های واگیر، اداره بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان، سال ۱۳۹۰، ۷۲ ص
2. Kumar R, Bumb RaA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. Cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania tropica* in bikaner, India parasite identification and characterizatoin using molecular and immunologic tools. Am J Trop Med Hyg 2007; 76 (5): 896-901.
3. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J Parasitol, 1999; 85(2):181-7.
4. Sharma. U, Singh. S. Insect vectors of leishmania: distribution, physiology, and their control. J vector 2008; B D 45, PP.255-272.
5. World Health Organization (WHO). Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. World Health Organization Technical Report Series No. 949; WHO: Geneva, Switzerland, 2010
6. Faïman R, Cuno R, Warburg A. Control of Phlebotomine sand flies with Vertical fine-Mesh Nets. J Med Entomol, 2009; 46(4):820-831.
7. Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. Parasitol Today 1992 Mar; 8(3):104-105.
8. Bhunia GS, Kesari S, Chatterjee N, Pal DK, Kumar V, Ranjan A, Das P. Incidence of visceral leishmaniasis in the Vaishali district of Bihar, India: spatial patterns and role of inland water bodies. Geospatial Health 2011; 5(2):205-215.
۹. اردهالی ص، رضایی ح ر، ندیم ا. انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها، تحریر دوم، مرکز نشر دانشگاهی تهران، ۱۳۷۳، ۲۰۸ ص.
۱۰. صوفی زاده ا، راثی ی، عبایی م ر. خصوصیات اکولوژیک ناقلین بیماری لیشمانیوز در شهرستان کلاله - استان گلستان در سال ۸۶-۱۳۸۵. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / پاییز ۱۳۸۸، ۱۱(۳): ۸۱-۸۵.

11. Yaghoobi-Ershadi, MR., Javadian, E. Studies on sand flies in a hyper endemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Indian J. Med. Res.* 1997; 105: 61-66.
12. Rassi Y, Javadian E, Amin M, Rafizadeh S, Vatandoost H, Motazedian H. *Meriones libycus* is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south Islamic Republic of Iran. *East Med Health J* 2006; 12(3-4):475-477.
13. Rassi Y, Gassemi MM, Javadian E, Rafizadeh S, Motazedian H, Vatandoost H. Vectors and reservoirs of cutaneous leishmaniasis in Marvdasht district. Southern Islamic Republic of Iran. *East Med Health J* 2007; 13(3):686-693.
14. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebail M, et al. Molecular Detection of *leishmania major* in the vectors and reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis in Kalaleh district, Golestan province, Iran. *Iran J Arthropod-Borne Dis* 2008; 2(2):21-27.
15. Abai MR, Rassi Y, Imamian H, Fateh M, Mohebali M, Rafizadeh S, et al. PCR based on identification of vectors of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shahrood District, Central of Iran. *Pak J Bio Sci* 2007; 10: 2061-2065.
16. Yaghoobi-Ershadi MR. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Iran and their Role on *Leishmania* Transmission. *Iran J Arthropod-Borne Dis* 2012; 6(1): 1-17.
17. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebali M. Monthly variation of *leishmania major* MON26 infection rates in *phlebotomus papatasi* (Diptera, psychodidae) from rodent burrows in Badrood area of Iran. *Med J Islamic Rep Iran* 2001;15(3): 175-178.
18. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Abai MR, Ebrahimi B, Vafaei-Nejad R, Hanafi-Bojd AA, Jafari R. Epidemiological study in a new focus of Cutaneous leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Med. Health J.* 2003; 9(4): 816-826.

۱۹. کثیری ح، جوادیان ع. آلودگی لپتومونایی فلبوتوموس پاپاتاسی و فلبوتوموس صالحی در استان سیستان و بلوچستان. مجله بهداشت ایران. ۱۳۷۹، سال بیست و نهم، شماره ۱ تا ۴: ۱۵-۲۰.

20. Seyedi-Rashti MA, Keighobadi, K., Nadim, A. Urban Cutaneous leishmaniasis in Kerman, southeast Iran. Bull. Soc. Path. Exot. 1984; 77: 312-319.

21. Javadian E, Dehestani M, Nadim A, Rassi Y, Tahvidar – Bidruni, G.h, Seyedi-Rashti. MA, Shadmehr A. confirmation of Tatera indica (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous Leishmaniasis in the west of Iran. Iranian J. Publ. Hlth 1998; 27 (1-2), 55-60.

۲۲. میمندی نژاد م. سالک-کالا آزار (لیشمانیوز). انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۵۴، ۳۸۰ صفحه.

23. Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Mehdipour D, Abdoli H, Farzinnia B, Mohebbali M, Hajjaran H. Epidemic Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis due to Leishmania major in Ghanavat rural district, Qom Province, central Iran. Iranian J Publ Health 2003; 32:35-41.

24. Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Hasibi F, Jafari R, Abdoli H, Arandian MH et al. Emergence of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major in a new focus of Southern Iran. Iranian J Arthropod-Borne Dis 2007; 1(1):1-8.

25. Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P. Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. Exp Parasitol 2010; 126(4):552-556.

26. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Yaghoobi Ershadi MR, Mohebbali M. Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri: a probable vector of Leishmania infantum in Iran. Ann Trop Med Parasitol. 2006; 100:63-68.

27. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Asgari Q, Yaghoobi-Ershadi MR. First detection of Leishmania infantum in Phlebotomus (Larrousius) major (Diptera: Psychodidae) from Iran. J Med Entomol. 2008; 45:726-731.

28. Azizi K, Rassi Y, Moemenbellah-Fard MD. PCR-based detection of *Leishmania major* kDNA within naturally infected *Phlebotomus papatasi* in southern Iran. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104:440–442
29. Oshaghi MA, Yaghoobi-Ershadi MR, Abbasi M, Akhavan AA, Rahimi- Foroshani A, Zahraei AR, Rassi Y, Mohtarami F. Detection of *Leishmania major* in naturally infected sand flies using semi Nested-PCR. *Iranian J Publ Health.* 2008; 36:59–64.
30. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA Fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2008b; 13(9): 1159–1171.
31. Rassi Y, Javadian E, Nadim A, Tahvildar-Bidruni GH. Natural promastigote infection of sand flies and its first occurrence in *Sergentomia dentata* in Ardabil Province, north west of Iran. *Iran. J Publ Health* 1997; 26:7–12.
32. Rassi Y, Javadian E, Jalali M, Motazedian MH, Vatndoost H. Investigation on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis, Southern Iran. *Iran J Publ Health* 2004; 33(1): 31-35.
33. Rassi Y, Javadian E, Nadim A, Zahraii A, Vatandoost H, Motazedian H, Azizi K, Mohebbali M. *Phlebotomus (Larroussius) kandelakii* the principal and proven vector of visceral leishmaniasis in north west of Iran. *Pak J Biol Sci.* 2005; 8:1802–1806.
34. Rassi Y, Abai MR, Javadian E, Rafizadeh S, Imamian H, Mohebbali M, Fateh M, Hajjarian H, Ismaili K. Molecular data on vectors and reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Bull Soc Pathol Exot.* 2008a; 101: 425–428.
35. Rassi Y, Javadian E, Nadim A, Rafizadeh S, Zahraii A, Azizi K, Mohebbali M. *Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus*, a vector of *Leishmania infantum* in northwestern Iran. *J Med Entomol.* 2009; 46:1094–1098.
36. Rassi Y, Abai MR, Javadian E, Rafizadeh S, Imamian H, Mohebbali M et al. Molecular detection of *Leishmania* infection due to *Leishmania major* and *L.*

turanica in the vectors and reservoir host in Iran. Vect Borne Zoonotic Dis 2011; 11(2):145–150

37. Rassi Y, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebbali M, Yaghoobi-Ershadi MR et al. *Phlebotomus papatasi* and *Meriones libycus* as the vector and reservoir host of cutaneous leishmaniasis in Qomrood District, Qom Province, central Iran. Asian Pac J Trop Med 2011a; 4(2):97–101.

38. Rassi Y, Abai MR, Oshaghi MA, Javadian E, Sanei A, Rafidzadeh S, Arzamani K. First detection of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus kandelakii* using molecular methods in north-eastern Islamic Republic of Iran. East. Mediterr Health J 2012; 18(4):387-392.

39. Rassi Y, Sanei Dehkordi AR, Oshaghi MA, Abai MR, Mohtarami F, Enayati AA et al. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in northwestern Iran. Exp Parasitol 2012a; 131:344–349.

40. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Tahvildare-Bidruni GH. *Leishmania major* MON-26 isolated from naturally infected *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Esfahan Province, Iran. Acta Trop 1995; 59:279–282

41. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Kanani A. Host preference pattern of phlebotomine sand flies of Borkhar rural district, Esfahan Province, Iran. Acta Trop 1995a; 60:155–158.

42. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebbali M. *Meriones libycus* and *Rhombomys opimus* (Rodentia: Gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996; 90:503–504.

43. Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Javadian E, Jafari R, Zahraei-Ramazani AR, Mohebbali M. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. Saudi Med J. 2002; 23:291–294.

44. Yaghoobi-Ershadi MR, Hakimiparizi M, Zahraei-Ramazani AR, Abdoli H, Aghasi M, Arandian MH, Ranjbar AA. Sand fly surveillance within an emerging epidemic

focus of cutaneous leishmaniasis in southeastern Iran. Iran J Arthropod-Borne Dis. 2010; 4:17–23.

45.Yaghoobi-Ershadi MR, Shahbazi F, Darvishi M, Akhavan AA, Jafari R, Khajeian M, Rassi Y, et al. Molecular Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in the Focus of Bushehr City, Southwestern Iran. Iran J Arthropod-Borne Dis, December 2013; 7(2):113–121.

46.Mohebbali M. Visceral leishmaniasis in Iran: Review of the Epidemiological and Clinical Features. Iran J Parasitol. July -Sep 2013; 8(3):348-358.

47.Mohebbali M, Malmasi A, Hajjarian H, Jamshidi S, Akhoundi B, Rezaei M, Janitabar S, Zarei H, Charehdar S. Disseminated Leishmaniasis Caused by *Leishmania tropica* in a Puppy from Karaj, Central Iran. Iran J Parasitol 2011; 6(2):69-73.

۴۸. غروی م ج. تک یاخته شناسی پزشکی. چاپ سوم، نشر طبیب، ۱۳۸۳، ۴۴۲ ص.

49.Ashford RW, Bettini S. Ecology and epidemiology: Old World. In Peters W & Killick-Kindrick R. (eds). The leishmaniases in biology and medicine, Orland Academic Press, 1987; 1:366-424.

50.Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. Microb. Infect, 2000, 2:1–9.

51.Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG. A role for insect galectins in parasite survival. Cell, 2004, 119(3):329–41.

52.Wincker P., Ravel C., Blaineau C., Page`s M., Jauffret Y., Dedet J.P. and Bastien, P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Research 24, 1996; 1688–1694.

53.Wong A.K. Molecular genetics of the parasitic protozoan *Leishmania*. Biochem and Cell Biol, 1995, 73, 235–240.

54.Franco Al. Genetic structure of populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean.International Journal for parasitology. DOI:10.1016/j.ijpara.2010.03.017.

55.Cruz A.K., Titus R. and Beverley S.M. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. Proceed N Acad Sci USA, 1993; 90: 1599–1603.

56.Peter JM, Nicolas F. *Leishmania: after the genome*. Horizon Scientific Press, 2008 - Medical - 306 pages

57.Donelson, J.E., Gardner, M.J. and El-Sayed, N.M. More surprises from Kinetoplastida. Proceed N Acad Sci USA, 1999, 96: 2579–2581.

58.Sturm NR, Simpson L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase sub unit III mRNA. Cell, 1990; 61: 879-884.

59.Singh S., Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med, 2003, 49: 55-60.

60.Lintone Y.M. & smith L. Morphological & molecular Characterization of *An.stephensi* member of *Maculipenis* complex, syste. Entomol, 2003, 28: 39-55.

61.Hoezel A.R. & Dover G.a. *Molecular genetic ecology*, Oxford University press pp, 1991, 75.

62.Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidrune GH, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran: B. Khorassan, Part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen, Bull.Soc.Path.Exot.,1976; 2: 140-143.

۶۳. جعفری ر. بررسی لیشمانیوز جلدی در شهر نیک آباد و روستاهای تابعه (دهستان جرقویه از شهرستان اصفهان)، پایان نامه جهت دریافت درجه فوق لیسانس علوم بهداشتی در رشته حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۷، شماره ۲۶۶۴.

۶۴. جوادیان ع. بررسی لیشمانیوز جلدی در استان خوزستان ، تعیین مخزن بیماری. فعالیت های معاونت پژوهشی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی در سال ۱۳۶۷، نشریه شماره ۲۱۲۰۱، ۱۳۶۸، ۶۵ ص.

۶۵. جوادیان ع، سیدی رشتی م ع، یعقوبی ارشادی م ر. کانون های لیشمانیوز جلدی روستایی با تاکید بر مخازن حیوانی آن در ایران. سمینار بررسی لیشمانیوز در ایران. معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی سپاه پاسداران انقلاب اسلامی. مقاله ۱۴. دی ماه ۱۳۷۰

۶۶. درودگر ع. فون پشه خاکی ها و وضع کنونی لیشمانیوز جلدی در کاشان. پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد در رشته حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۰، شماره ۱۸۹۵

۶۷. دهقانی تفتی ع. تعیین فون پشه خاکی های استان یزد و بررسی لیشمانیوز جلدی در کانون چاه افضل و چامک. پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد در رشته حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۳، شماره ۲۱۸۴

۶۸. زهرایی رضایی ع. بررسی وضع لیشمانیوز جلدی در شهر اصفهان (ناقل، مخزن، عامل). پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد در رشته حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۰، شماره ۱۹۴۶.

۶۹. ندیم ا، سیدی رشتی م ع. لیشمانیوز جلدی در خراسان. مجله بهداشت ایران، سال اول، شماره ۲، ۱۳۵۱، ص: ۱۶۸ - ۱۵۴.

۷۰. یعقوبی ارشادی م ر. بررسی وضع فعلی اپیدمیولوژی لیشمانیوز جلدی در بخش هایی از کانون آندمیک اصفهان به منظور طرح و پیشنهاد برنامه کنترل. پایان نامه جهت دریافت دکتری Ph.D در رشته حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۲، شماره ۲۰۶۷

71. Nadim A, Seyedi-Rashti MA. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. Acta Trop. 1971; 14:99-106.

72. Rassi Y, Jalali M, Javadian Ex, Motazedian MH. confirmation of *Meriones libycus* (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Arsanjan, Fars Province, South of Iran. (1999 – 2000). Iran. J Publ. Hlth. 2001; 30(3-4):143-144.

73. Kassiri H, Javadian E. A report on the natural leptomonal infection of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus salehi* in Sistan- Baluchistan province (South East of Iran] Persian. Iran J Publ Health 2000; 29(1-4):15-20.

74. Mehrabani D, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Owji SM, Oryan A. *Leishmania major* in *Tatera indica* in Fasa, Southern Iran: Microscopy, Culture, Isoenzyme, PCR and morphologic study. Asian J Ani and Vet Adv., 2011; 6(3):255-264.

75. Davami MH, Motazedian MH, Kalantari M, Asgari Q, Mohammadpour I, Sotoodeh-Jahromi et al. Molecular survey on detection of leishmania infection in rodent reservoirs in Jahrom district, Southern Iran. Iran. J Arthropod-Borne Dis, 2014; 8(2):139–146.

76. Vazirianzadeh B, Saki J, Jahanifard E, Zarean M, Amraee K, Navidpour Sh. Isolation and identification of leishmania species from sand flies and rodents collected from Roffaye district, Khuzestan province, Southwest of Iran. Jundishapur J Microbiol 2013; 6(6):e10025

77. Azizi K, Kalantari M, Asgari Q, Turki H, Shahi M, Fekri S. Report on *Leishmania* Infection of *Gerbillus nanus* (Rodentia: Muridae) as the Reservoir Host of *Leishmania Major* in Hormozgan Province. Zahedan J Res Med Sci 2012; 14(8):6-10.

۷۸. صداقت م م، صلاحی مقدم ع. نقشه سازی حدود جغرافیایی جوندگان مخازن مهم بیماری در ایران. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، ۱۳۸۹، دوره ۸، شماره ۳: ۲۱۰-۲۲۳

79.Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Khamesipour A, Mirhendi H, Alimohammadian MH, Rassi Y, Arandian MH, Jafari R, Abdoli H, Shareghi N, Ghanei M, Jalali-Zand N. Dynamics of Leishmania infection rates in Rhombomys opimus (Rodentia:Gerbillinae) population of an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Bull Soc Pathol Exot. 2010a; 103:84–89.

۸۰. ندیم ا، جوادیان ع، محبعلی م، ضامن مومنی ع. انگل لیشرمانیا و لیشرمانیوزها، تحریر سوم. مرکز نشر دانشگاهی تهران، ۱۳۸۷، ص ۱۷۷–۲۰۸.

۸۱. راثی ی، محمدقاسمی م، جوادیان ع، معتضدیان ح، رفیع زاده س، آقایی افشار ع، رفیع نژاد ج، جلالی م. تعیین مخازن و ناقلین لیشرمانیوز جلدی به روش مولکولی Nested-PCR در روستاهای شهرستان مرودشت، استان فارس. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۸۶، ۱۴(۲): ۱۳۹–۱۴۳.

82.Pionar GJ. Early cretaceous Trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102:635-637.

۸۳. متقالی ا. پشه خاکی های ایران. گزارش پنجمین کنگره پزشکی ایران. ۱۳۳۵، شماره ۲۰۳: ۳۱۰–۳۱۹.

84.Lane R.P. Sand flies (Phlebotominae). In: Lane, R P and Crosskey R W (Eds) medical Insects and Arachnids. Chapman & hall, London, 1993: 78-109.

۸۵. راثی، ی.، حنفی بجد، ا.ع. پشه خاکی ها، ناقلین لیشرمانیوزها، چاپ اول، انتشارات نوآوران علم، تهران، ۱۳۸۵، ۲۵۱ص

86.Adler S,Theodor O. Transmission of disease agents by phlebotominae sandflies. Ann.Rev. Entomology 1957; 2:203-226.

87.Lewis DJ. Phlebotominae Sandflies. Bull. Wld With. Org 1971; 44: 535-551.

88.El Sawaf B.M., Mansour N.S., EL Said S.M., Daba S., Youssef F.G., Kenawy M.A., Beirr J.C. (1989) Feeding patterns of phlebotomus papatasi and phlebotomus langeroni in EL Agamy, Egypt. J. Med. Ent. 1989;, 26: 497-498.

- 89.Oshaghi MA., Ravasan NM., Javadian EA., Rassi Y., Sedaghat MM., Mohebbali M., Hajjarian H. Development of species-specific PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assays for *L.infantum*/*L.donovani* discrimination. *Exp Parasitol.* 2009b; 122: 61-65.
- 90.Ghosh K.N., Ghosh D.K., Bhattachary A. Biology of *phlebotomus argentipes* and *p. papatasi* in the laboratory. *Ann. Parasit. Hum.Comp* 1992; 67: 55-61.
- 91.Yaghoobi-Ershadi MR. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Iran and their Role on *Leishmania* Transmission. *Iran J Arthropod-Borne Dis* 2012; 6(1): 1–17.
- 92.Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E. Seasonal variation of *Leishmania major* infection rates in sand flies from rodent burrows in Isfahan province. *Iran Med. Vet. Entomol.* 1996a; 10:181-184.
93. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebbali M. Monthly variation of *leishmania major* MON26 infection rates in *phlebotomus papatasi* (Diptera, psychodidae) from rodent burrows in Badrood area of Iran. *Med J Islamic Rep Iran* 2001;15(3): 175-178.
- 94.Yaghoobi-Ershadi, MR., Hanafi-Bojd, AA, Akhavan, AA., et al (2001) Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to *L.major* in Ardestan town, Central Iran. *Acta Trop Iranica*, 2001a; 79: 115-121.
- 95.Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Abai MR, Ebrahimi B, Vafaei-Nejad R, Hanafi-Bojd AA, Jafari R. Epidemiological study in a new focus of Cutaneous leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Med. Health J.* 2003; 9(4): 816-826.
- 96.Killick-Kendrick R. The biology of *leishmania* in phlebotominae sandflies. In: *Biology of kinetoplastida*, Vol. 2.(ed. By W.H.R Lumsden & D.A. Evans) Academic press, London 1979: 395-460.

97. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis, Report of WHO Expert Committee, Technical Report Series, 1990; 793, 159 pp.

98. Schlein Y, Jacobson RL. Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. *Parasitology* 1994; 109:23-28.

99. World Health Organization. Control of tropical disease, The leishmaniasis. WHO. 1993; C.T.D./I.C.O./93.2.14 pp.

۱۰۰. سیدی رشتی م.ع. بررسی فلبوتومینه های مدیترانه شرقی. پایان نامه MSPH در رشته حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۵۰، شماره ۱۵۱.

۱۰۱. سیدی رشتی م.ع. بررسی فلبوتومینه های مدیترانه شرقی، پایان نامه دکتری تخصصی در رشته انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۶۵، شماره ۱۴۶۵

102. Moin-Vaziri V, Depaquit J, Yaghoobi-Ershadi MR, Oshaghi MA, Derakhshandeh Peykar P, Ferte H, Kaltenbach M, Bargues MD, Leger N, Nadim A. Intraspecific variation within *Phlebotomus sergenti* Parrot (1917) (Diptera:Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran. *Acta Trop.* 2007; 102:29–37.

103. Oshaghi MA, Rasolian M, Shirzadi, MR, Mohtarami F, Doosti S. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. *Exp. Parasitol.* 2010; 126:445–450.

104. Bahrami A, Rassi Y, Maleki N, Oshaghi MA, Mohebbali M, Yaghoobi-Ershadi MR, Rafizadeh S. *Leishmania infantum* DNA detection in *Phlebotomus tobbi* in a new northern focus of visceral leishmaniasis in Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 2014; 4(2):110-114.

105.Karimi A, Hanafi-Bojd AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Ghezelbash Z. Spatial and temporal distributions of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae), vectors of leishmaniasis, in Iran. *Acta tropica*, 2014; 132: 131-139.

۱۰۶. وهابی ا، یعقوبی ارشادی م ر. تعیین فون، میزان انتشار و فعالیت فصلی فلبوتومینه ها در استان کرمانشاه. خلاصه مقالات اولین کنگره حشره شناسی پزشکی ایران، انستیتو پاستور ایران و دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۲۳ تا ۲۵ خرداد ۱۳۷۷: ۸۶-۸۷

107.Sayyadi M, Vahabi A, Sayyad S, Gharib A, Vahabi B. An Entomological survey of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Ravansar County, Kermanshah Province, west of Iran.. *Life Sci J* 2013;10(12s):873-877.

۱۰۸. روشن قلب م، پرویزی پ. جداسازی و تعیین هویت انگل لیشمانیا میجر و لیشمانیا تورانیکا در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی روستایی در منطقه ترکمن صحرای استان گلستان. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، سال ۱۳۹۰، دوره بیست و یکم، ویژه نامه ۱: ۷۴-۸۳.

۱۰۹. درودگر ا، دهقانی ر، هوشیار ه. شیوع سالک در آران و بیدگل. مجله دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ۱۳۷۸، ۸۴: ۱۱-۹۲.

110.Azizi K, Kalantari M, Fekri S, The nested-PCR based detection of cutaneous leishmaniasis vectors in Jask County, Hormozgan, Iran. *Iranian J. Epidemiol.* 2011; 7:27-33.

111.Azizi K, Fakoorziba MR, Jalali M, Momenbellah-Fard MD. First molecular detection of *Leishmania major* within naturally infected *Phlebotomus salehi* from a zoonotic cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. *Trop. Biomed.* 2012a; 29:1-7.

112.Seyedi Rashti MA, Sahabi Z, Kanani Notash A. *Phlebotomus* (Larroussius) *keshishiani* Shchurenkova 1936 another vector of visceral leishmaniasis in Iran. *Iranian J. Publ. Health* 1995; 24(1-2):25-30.

- 113.Sanei Dehkordi A, Rassi Y, Oshaghi MA, Abai MR, Rafizadeh S, Yaghoobi-Ershadi MR, Mohebalı M, Zarei Z, Mohtarami F, Jafarzadeh B, Ranjbarkhah A, Javadian E. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus* in Bilesavar District, Northwestern Iran. *Iranian J. Arthropod-Borne Dis.* 2011; 5:20–27.
- 114.Salgame P., Abrams J. S., Clayberger C., 1993, Differing Lymphokine profiles of functional subsets of Human CD4 and CD8 T cell clones, *Science*, 254: 279-282
- 115.Spits H., IL-4: Structure and function, CRC press Inc, Bica Raton, Fl., 1992; 25-31
- 116.Rosenwas er LJ, Klemm DJ, Dresback JK, et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Al ergy.* 19 5; 25: 74-8.
- 117.Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Gharesi- Fard B, et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibil ty to recur ent pregnancy los in Iranian women. *J Rep Immunol.* 200 5; 65: 171-8.
- 118.Andrew G. Gianoukakis,Terry J. Smith.The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Endocrine Disease. *Can J Diabet* 2004;28 (1): 30-42.
- 119.Walter MR, Cook WJ, Zhao BG, Cameron RP, Ealick SE, Walter RL, Reichert P, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE ..Crystal structure of recombinant human interleukin-4. *J. Biol. Chem.* 1992 ;**267** (28): 20371–6.[PMID 1400355](#)
- 120.Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, Banchereau J, DeFrance T, Blanchard D, De Vries JE, Lee F, Arai K.Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*1986 ; 83(16): 5894–8. doi:10.1073/pnas.83.16.5894.
- 121.Carr C, Aykent S, Kimack NM, Levine AD . Disulfide assignments in recombinant mouse and human interleukin 4. *Biochemistry* 1991;**30** (6): 1515–23.doi:10.1021/bi00220a011. PMID 1993171.

122.Mosmann T R , Coffman R L. Th1 And Th2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann. Rev. Immunol.* 1989 ; 7:145-73.

123.Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gummy A, Egeter O, Sakrauski AK, et al. IL-4 instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol* 2001;2:1054–60.

124.Aseffa A, Gummy A , Pascal Launois, H. MacDonald R, Jacques A. ,et al.The Early IL-4 Response to *Leishmania major* and the Resulting Th2 Cell Maturation Steering Progressive Disease in BALB/c Mice Are Subject to the Control of Regulatory CD4CD25 T Cells. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 3232–3241.

125.Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol.*2009 ; 25(8):383-91.

126.Kamali-Sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H, Gharezi-Fard B. (2006). Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients, *Cytokine.*, 2006; 35:159–165.

127.Salhi A, Rodrigues VJ, Santoro F, Dessein HA, Romano L, Castellano R. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J. Immunol.*2008; 180: 6139–6148.

128.Sokol C L, Barton G M , Farr A G , Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses . *Nat Immunol* 2008 ; 9 (3): 310–318.

129.Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med.*1997; 337 (24): 1720–5.

130.Ritter U, Moll H. Monocyte chemotactic protein- stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, act synergistically with IFN- γ and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol.* 2000 ;30:3111–20.

131.Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigen. J Exp Med. 1988 ;168:1675–84.

132.Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Dipadova K, Behin R. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* infection and mount a polarized Th2 cell response. Eur J Immunol.1996 ; 26:1553–9.

133.Kopf M, Brombacher F, Kohler G, Kienzle G, Widmann KH, Lefrang K. IL-4 deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. J Exp Med.1996 ; 184:1127–36.

134.Guler ML, Jacobson NG, Gubler U, Murphy KM. T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling. J Immunol. 1997 ;159:1767–74.

135.Sacks D and Noben-Trauth N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol 2002; 2(11):845-58.

۱۳۶. فتاحی بافقی، ع. ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی بر ضد مولکول‌های LPG و gp6 در موش BALB/c و بیماران انسانی بهبود یافته و بهبود نایافته. پایان‌نامه دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته انگل شناسی. دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۲.

137.Lorelance JD, Gottlieb M. (1986). comparison of extra cellulat acid phosphatase from obvious isolates of leishmania. Am J Trop Med Hyp.1986 ; 35:112-8

138.Chenik M, Lakhal S, Ben Khalef N, Zribi L,Louzir H,Dellasi K. Approches for the identification of potential excreted/secreted proteins of leishmania major parasites. Parasitology.2006 ; 132:493-509.

139. Martin Howel W, Mat hew J, Rose-Zeril i, et al. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibil ty, and Prognosis. Nutr. 2007; 137: 194S-199S

140. Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, Peacock CS, Khalil EA, Cordell HJ, Howson JM, El Hassan AM, Bereir RE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. Genes Immun. 2003; 4(5):351-5.

۱۴۱. دانشمندی س ، پورفتح ژنوتیپ ع الف ، کاظمی عرب آبادی م ، حسن شاهی غ ح ، رضاییان م ، آسیابانها رضایی م . . بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم های موجود در ژنهای اینترلوکین-۴ و اینترفرون-گاما با بیماری دیابت نوع ۲. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۳۸۷، ص ۳۵-۴۱

142. Noyes HA, Reyburn H, Baiely JW, Smith D . A nested-PCR-based schizodememethod for identifying Leishmaniakinetoplast minicircle classes directlyfrom clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. J Clin Microbiol. 1998;36: 2877-2881.

143. Strelkova M. V. Progress in studies on Central Asian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis: A review. Folia Parasitologica. 1996; 43:1-6.

144. Strelkova M V, Eliseev L N, Ponirovsky E N, Dergacheva T I, Annacharyeva D K, Erokhin P I et al. Mixed leishmanial infections in Rhombomys opimus: A key to the persistence of Leishmania major from one transmission season to the next. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 2001;95:811-819.

145. Rassi Y, Karami H, Abai M R, Mohebalı M, Bakshi H, Oshaghi M A, Rafizadeh S, Bagherpoor Hagigi H, Hosseini A, Gholami M. First detection of Leishmania infantum DNA in wild caught Phlebotomus papatasi in endemic focus of cutaneous leishmaniasis, South of Iran. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(10): 825-829

146. Dobson D E, Kamhawi S, Lawyer P, Turco S J, Beverley S M, Sachs D L. *Leishmania major* survival in selective Phlebotomus papatasi sand fly vector

requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. PLoS Pathogens,2010; 6.

147.Wilson R, Bates M D, Dostalova A, Jecna L, Dillon R J, Volf P, Bates P A. Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay.2010; PLoS Neglected Tropical Diseases, 4. www.who.int/tdr

148.Kassiri H, RezaNaddaf S, Mohebbali M, Javadian E . Molecular characterization of Leishmania infection in sand flies from Sistan Va Baluchistan Province, southeastern Iran. Jundishapur J Microbiol.2012; 2 :430-1.

149.Azizi K, Fakoorziba M, Jalali M, Moemenbellah-Fard M . First molecular detection of Leishmania major within naturally infected Phlebotomus salehi from a zoonotic cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. Trop Biomed.2012; 29(1): 1-8.

150.Gora D, Yaya T, Jocelyn T, Didier F, Maoulouth D, Amadou S, Ruel TD, Gonzalez JP . The potential role of rodents in the enzootic cycle of rift valley fever virus in Senegal. Microbes Infect.2000 ; 2:343-346.

151.Arntzen L, Wadee AA, Isaäcson M. Immune responses of two Mastomys sibling species to Yersinia pestis. Infect Immun.1991 ; 59:1966-1971.

152.Korobitsyna KV. Analysis of the interpopulation karyotype variability in Meriones meridianus with special reference to the resistance against the plague microbe. Zool Zh. 1974; 53:1066-1069.

153.Mills, JN.Regulation of rodent-borne viruses in the natural host: implications for human disease. Infectious Diseases from Nature: Mechanisms of Viral Emergence and Persistence. 2005 ;45-57.

154.Mencacci A, Del Sero G, Cenci E, d'Ostiani CF, Bacci A, Montagnoli C, et al. Endogenous interleukin 4 is required for development of Med. T helper type 1 cell responses to Candida albicans. J Exp Med 1998;187:307–17.

155.Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in IL-4 deficient mice. *Science* 1996;271:987–90.

156.Noben-Trauth N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. *Immunol Lett* 2000;75:41–4.

